



Rapport de mission au Brésil

du 27/10/2010 au 20/11/2010

**Suivi des projets de recherche sur *Hevea* développés en partenariat avec le
Brésil**

Rencontre France – Brésil de Bioinformatique (UESC, Ilhéus, Bahia)

Dominique GARCIA

BIOS 96 2010 10246

Résumé

Le programme d'amélioration de la résistance au SALB et d'adaptation de l'hévéa aux régions sub-optimales a été initié en 1992 au Brésil au sein d'une collaboration entre le CIRAD et Michelin. Depuis 2004, le programme d'amélioration s'est ouvert aux universités sur des thématiques en biologie avancée en impliquant initialement, l'Université de Santa Cruz (UESC, Ilhéus), puis l'UEFS, UNICAMP, UFV, FMRP/USP, LNCC. Depuis juillet 2010, ce réseau de recherche ne bénéficiant plus sur place de l'appui d'un chercheur CIRAD, cette mission a eu pour objectif d'assurer le suivi des activités en cours et de participer en tant que membre organisateur au workshop France - Brésil de bioinformatique.

1. Programme d'amélioration Cirad – Michelin - Brésil (Plantation E. Michelin, Itiquira, Mato Grosso)

Suite à la vente des surfaces industrielles de la plantation E. Michelin, une nouvelle organisation de management centralisant les décisions sur la plantation de Bahia a été mise progressivement en place depuis 2009. Aujourd'hui, 870 ha sont consacrés à l'expérimentation sous la dénomination de *Nova PEM*.

Cette mission d'appui technique a permis de sélectionner de nouveaux génotypes à partir des données 2010 de production obtenues dans les CCPE 3 et 6, de mettre en place une démarche d'évaluation des tests DHS en vue de la protection des premiers clones CMB. Deux techniciens ont été formés pour documenter les 24 descripteurs définis sur *Hevea*. Les bases de données agronomiques des 15 parcelles expérimentales en évaluation ont été actualisées.

Afin de préparer les échantillons nécessaires au projet transcriptôme (matériel induit par le froid: tige, feuille, pétiole), des plants des génotypes RRIM600, PR255 et PB260 ont été greffés. Suite à un dysfonctionnement de la chambre froide, la réalisation des inductions a été reportée. Un protocole et des instructions ont été laissés afin que ce matériel végétal soit préparé.

2. Rencontre France-Brésil de Bioinformatique (UESC, Ilhéus, Bahia)

Réalisée entre le 8 et le 12 novembre, cette rencontre a été promue par le CIBA Consortium International en Biologie Avancée qui a comme base, au Brésil l'Embrapa et les Universités impliquées dans des projets bilatéraux, et en France, Agropolis-International qui réunit trois organismes de recherche, CIRAD, IRD et INRA.

Cette rencontre a permis de réunir 100 étudiants et chercheurs français et brésiliens autour de l'analyse des données produites par les technologies –omiques. Les sujets abordés au travers de cours théoriques et pratiques ont été les suivants: les technologies de séquençage, le prétraitement des données, l'alignement des séquences, la comparaison des génomes, l'annotation des séquences, la détection de polymorphisme de nucléotides, la structure des protéines, la biologie des systèmes.

Faisant suite au workshop, une réunion CIBA a permis de dresser un panorama mettant en évidence l'insuffisance au Brésil de formations en bioinformatique à différents niveaux (étudiant, chercheur et bio-informaticien). Sous l'égide du CIBA, une lettre d'intention sera rédigée afin d'appuyer auprès des organismes de financement les demandes de soutien pour la formation, la consolidation de plateforme en bioinformatique et la demande de missions d'appui de bioinformaticiens.

3. Comité de pilotage du projet transcriptome *Hevea* (FMRP/USP; Ribeirão Preto, São Paulo)

Ce projet initié en 2009 avec l'appui financier du CNPq (PROSUL) vise l'isolement et l'identification chez l'hévéa de gènes associés à la tolérance à des stress biotiques et

abiotiques. Au cours de la première année du projet, un pilote de séquençage de cDNA par 454 GS FLX obtenus à partir de différents organes du cultivar RRIM600, a permis d'établir un protocole expérimental de la préparation des échantillons jusqu'au traitement bioinformatique des données. Ce comité de pilotage a permis d'identifier les analyses nécessaires à court terme de façon à obtenir les informations pour la production d'un premier article. Autre : invitation cours d'été (février 2011) de Xavier Argout ; transfert du pipeline ESTtik vers le FMRP/USP et possibilité d'adaptation pour inclure dans le pipeline Newbler 2.5.

4. Suivi du doctorat de Daniela Martins Koop : Etude histo-cytologique et génomique fonctionnelle de l'interaction *Hevea* – *Microcyclus ulei* (3/2010 – 2/2014)

Le matériel végétal nécessaire aux travaux de cytologie et d'études d'expression a été échantillonné.

Mise au point de protocoles de préparation du matériel pour les études cytologiques. Problème de coupes sur matériel très jeune (feuilles anthocyaniques). Pas de problème sur temps 96 et 168 hpi. Contact pris avec le laboratoire de microscopie de la Fiocruz (Salvador, Bahia) pour réalisation observations microscopie à balayage.

Transfert sur la UESC, protocole d'extraction des ARN (Morcillo et al., 2006). Des extraits d'ARN à partir de feuilles saines et infectées seront préparés au cours du premier semestre 2011 afin de préparer la mission de l'étudiante sur la plateforme de génomique fonctionnelle du CIRAD (mission envisagée au cours du deuxième semestre 2011, demande faite d'appui incitatif n°1/2011).

Participation à deux congrès nationaux avec présentation de poster.

Voyage :

27/10/2010. Montpellier – Paris – Rio de Janeiro
28/10/2010. Rio de Janeiro – Campo Grande – PEM
06/11/2010. PEM – Cuiaba – São Paulo – Ilhéus
16/11/2010. Ilhéus – Ribeirão Preto
20/11/2010. Ribeirão Preto – Rio de Janeiro
26/11/2010. Rio de Janeiro – Paris - Montpellier

Personnes rencontrées :**I. Plantation E. Michelin**

Philippe Carty	Directeur PEM
Cicero Cassimiro	Superviseur PEM
Lucinaldo Fereira	Superviseur PEM
Saulo Emilio Almeida Cardoso	Chef de secteur du laboratoire de recherche PEM et PMB Responsable de l'activité DL et du développement des COV obtenu sur PEM
Anquise Souza França	Chef de secteur des essais agricole PEM et PMB Responsable des essais agronomiques sur PEM

II. UESC

Daniela Martins Koops	Thésarde (génomique interaction <i>Hevea-M. ulei</i>)
Fabienne Micheli	Chercheur CIRAD/UESC
Karina Gramacho	Chercheur CEPLAC
Marisa Fabiana Nicolás	Chercheur LNCC
Fatima Alvim Cascardo	Chercheur/enseignant UESC

Membres du Comité Opérationnel et Comité de Pilotage du CIBA:

Ana Miranda Brasileiro	Chercheur Embrapa/CENARGEN
Pierre Marraccini	Chercheur CIRAD/CENARGEN
Bernard Mallet	Directeur régional CIRAD

III. UMRP

Wilson Araújo de Sousa Jr.	Prof. FMRP/USP. Coord. Projet Transcriptôme Hevea
Luis Gonzaga Paula de Almeida	Ingénieur informatique LNCC
Israel Tojal da Silva	Professeur Universitaire en bioinformatique FMRP/USP
Daniel Guariz Pinheiro	Post-doctorant en bioinformatique FMRP/USP
Leonardo Rippel Salgado	Doctorant FMRP/USP

I. Programme d'amélioration Cirad – Michelin - Brésil (Plantation E. Michelin, Itiquira, Mato Grosso)

Objectifs de la mission sur PEM :

- Appui technique sur les essais d'amélioration CMB, actualisation des bases de données et analyses des essais CCPE, CCGE.
- Entraînement à l'évaluation des descripteurs pour les tests DHS sur les clones CMB.
- Préparation et échantillonnage de matériel végétal pour le projet CNPq-PROSUL transcriptome *Hevea*.

1. Evolution organisationnelle de la Plantation E. Michelin

Depuis septembre 2009, 9000 ha d'hévéa de la plantation Michelin (81% de la surface plantée) ont été vendus au groupe Maggi. Ces surfaces ont été louées par ce dernier pour 10 ans au groupe Hevea-TEC qui depuis septembre 2010 les remet en saignée.

Des surfaces restantes, 1100 ha ont été vendus à 110 petits agriculteurs (PAF, Programa de Agricultura Familiar) et 870 ha sont dédiés à la recherche (amélioration variétale). Les surfaces destinées à la recherche ont été dénommées «*Nova PEM*». (Fig. 1). L'usine fait partie de *Nova PEM*.

Pour le programme CMB, la supervision technique des essais de PEM a été reprise par le département de recherche et développement de PMB depuis octobre 2009. A ce jour, l'équipe de *Recherche & développement* sur PEM est constituée de 2 superviseurs et de 11 journaliers permanents dont 9 en cours de formation pour réaliser les travaux de greffage et de saignée dans les parcelles expérimentales.

Figure 1 : Plan de *Nova PEM* et surfaces destinées à l'agriculture familiale.

dans des phases d'évaluation plus avancées que d'autres : certains ont été multipliés et implantés en CCGE, alors que d'autres (la majorité) sont encore dans leur phase immature. Afin de ne pas alourdir ce rapport, j'ai fait l'option de mettre en annexe le détail des observations et des analyses réalisées essai par essai et de ne s'attacher dans les paragraphes qui suivent qu'aux avancées obtenus sur le matériel aux différents stades d'évaluation et aux stratégies envisageables pour sauvegarder les efforts de création et sélection dans un contexte de réduction d'activités sur PEM et de risque d'abandon d'essais expérimentaux n'appartenant plus à *nova PEM*.

2.1 Les sélections variétales en saignée « industrielle » ou en attente de saignée industrielle

2.1.1 CCPE3

Dans le CCPE3, les arbres ont été évalués sur leur production en saignée précoce (arbres ouverts à 25cm de circonférence) sur deux années consécutives (2004-2005 à 2005-2006). En septembre 2008, seuls les arbres des 14 clones CMB dont la circonférence était supérieure à 45 cm ont été ré-ouverts.

En 2009-2010, pour l'ensemble des clones, les arbres dont la circonférence était supérieure ou égale à 45 cm ont été ré-ouverts. Ceci a permis de vérifier le potentiel de production des clones sélectionnés en 2006.

Parmi les 14 clones sélectionnés (n°63, 53, 89, 25, 68, 80, 35, 8, 86, 49, 65, 59, 84, 91, 50, 64, 7, 42), 7 d'entre-eux (25, 49, 53, 59, 63, 65, 84) présentent un comportement moyen en production et en croissance. Sur les données de production 2009-2010, la vigueur et l'architecture de l'arbre, 6 clones supplémentaires pourraient être récupérés (n°7, 27, 42, 50, 64, 81). En 2010-2011, la saignée industrielle sera poursuivie sur l'ensemble des clones. Toutefois, afin d'alléger la charge de travail, il pourrait être envisagé de ne s'intéresser qu'aux productions des 11 clones issus de la sélection en saignée précoce et des 6 clones récupérés.

2.1.2 CCPE4

En novembre 2010, les arbres du CCPE4 (âgé de 10.5 ans) dont la circonférence est supérieure ou égale à 45 cm (49%) devraient être remis en saignée. Compte tenu du faible nombre d'arbre, Eric Cavaloc et Cassio ont demandé à ce que la réouverture soit retardé et par ailleurs que les arbres soient ré-ouverts à 50 cm de circonférence.

Rappelons que 17 génotypes avaient été sélectionnés en 2008 sur les données de saignée précoce et croissance (n°47, 51, 52, 58, 59, 46, 44, 79, 86, 73, 81, 85, 90, 91, 25, 28, 94).

2.1.3 CCPE5

En septembre 2009, une sélection avait été faite sur les données de croissance, de saignée précoce et de DL (analyses de Dominique Garcia et André Clément-Demange). Dix génotypes avaient été retenus par les deux sélectionneurs (n°6, 10, 20, 38, 39, 50, 65, 66, 67, 80). Sept clones supplémentaires avaient été retenus par Dominique (n°12, 13, 21, 30, 33, 37, 69) et dix par André (n°26, 43, 52, 53, 60, 70, 72, 78, 82, 85). Les différences entre les sélections proviennent de la méthode d'estimation des valeurs génétiques des clones.

En mai 2010, 50 % des arbres ont atteint une circonférence de 45 cm. Il est intéressant de constater que globalement le matériel planté dans cet essai (âgé de 8.5 ans) présente une meilleure croissance que celui planté dans les précédents CCPE. Rappelons que ce CCPE a été planté à partir des familles présentant les meilleures croissances et productions dans les CES1, 2 et 3.

Cet essai sera ré-ouvert en novembre 2011.

2.2 Les sélections variétales en saignée précoce

2.2.1 CCPE6

Cet essai (planté en décembre 2003, 6ans) a été ouvert en décembre 2009 (80% des arbres) et saigné sans stimulation en D/3 e D/4 jusqu'en juin 2010. Huit familles de 10 clones et 1 famille de 5 clones sont en comparaison.

Un seul DL a été effectué le 26 mai 2010. Il est regrettable qu'un deuxième tour de saignée n'ait pas pu être réalisé ce qui aurait permis d'avoir des valeurs consolidées pour ces paramètres et élaborer une sélection sur les valeurs génétiques de ces paramètres.

En annexe sont présentés les résultats d'une première sélection réalisée sur les valeurs génétiques des clones pour leur croissance et leur production, ainsi que leur teneur en saccharose (1 répétition, valeur phénotypique). On constate que l'héritabilité de la production est forte. Elle est principalement liée à une grande variabilité entre clones dans les familles. L'héritabilité de la croissance est moyenne et correspond à une variabilité aussi importante au niveau de la famille qu'au niveau des clones dans les familles. On constate une relation inverse entre production et croissance pour 6 familles de l'essai. Parmi les meilleures familles sur le critère production, on trouve PB310xFX3864 suivi de IRCA109xRO45, alors que les meilleures familles en croissance sont IRCA109xPFB5 et GT1xTP21. Une sélection préliminaire de 20 clones est proposée.

A partir des données de saignée précoce qui seront obtenus en 2011, une sélection finale sera proposée.

2.2.2 CCPE7

Cet essai a été planté en janvier 2004 (essai âgé de 7 ans). Il comprend 12 familles (128 génotypes) :

- 93/114 x IRCA109
- 93/114 x PB260
- Avros 2037 x RRIM600
- GT1 x IRCA109
- GT1 x PB260
- GT1 x VN515
- IRCA109 x CDC273
- IRCA519 x FX3864
- PB260 x PR255
- PB260 x PR303
- PB260 x RRIM600
- RRIM600 x PB217

En mai 2010, des 2413 arbres vivants issus de croisements, 2015 arbres (83%) ont atteint la circonférence de 25cm. Cet essai devrait donc rentrer en saignée précoce en décembre 2010/janvier 2011. Ne pas oublier de faire au minimum 2 répétitions de DL au moment de la phase exponentielle de production (avril-mai 2011).

2.3 Les accessions en phase immature

Ceci concerne les CCPE8 à 12, soit 344 génotypes, le CCPE9 étant exclu (descendance PR255 x PB217).

Les données de croissance sont relevées annuellement.

2.4 CCGEs et parcelles monoclonales

Les CCGE 7 à 14 sont en phase immature. Dans le CCGE7, CCGE le plus ancien avec 9.7 ans, aucun des clones n'a atteint la circonférence d'ouverture 50 cm. Compte tenu des accroissements annuels, il est envisageable d'ouvrir cet essai en octobre 2012 suivant les normes retenues (200 arbres/hectares dont la circonférence est supérieure à 50cm).

Les CCGE 13 et 14 ont été plantés avec du matériel CMB. Leur croissance en hauteur, n'a pas permis à ce jour de recueillir des données de circonférence à 1m du sol. Les observations de ces clones au stade adulte sont poursuivies dans les CCPE.

Tableau 1 : Récapitulatif des CCGE non explorés sur leur potentiel production.

CCGE	Planting	Surface (ha)	Matériel	Objectifs
CCGE 7	Novembre 2000	7.13	TP749, IRCA41, IRCA145, IRCA317, FX4098, RRIC100, RRIM600, RRIM729, PR255, GT1	Adaptation régions sub-optimales
CCGE 8	Novembre 2002	7.13	PM10, IRCA22, IRCA209, IAC35, IAC40, RRIM711, RRIM937, RRIM938, PR255, GT1	Adaptation régions sub-optimales
CCGE 9	Décembre 2007	6.72	RRIM911, IRCA331, RRIM805, IRCA825, PB355, PB350, RRIM901, IRCA840, GT1, PR255	Adaptation régions sub-optimales
CCGE 10	Décembre 2004	4.16	PMB1, CDC308, CDC312, FDR5788, RRII105, GT1	Résistance au SALB Adaptation régions sub-optimales
CCGE 11	Janvier 2006	3.9	FDR5665, CDC56, IRCA427, FDR4575, MDX607, GT1	Résistance au SALB Adaptation régions sub-optimales
CCGE12	Décembre 2007	5.61	RRIM921, RRIM809, FDR5240, FDR5283, CD1174, MDX624, FDR5802, IRCA631, RRIM908, GT1	Résistance au SALB Adaptation régions sub-optimales
CCGE13	Décembre 2008	5.85	CMB516, CMB517, CMB518, CMB519, CMB520, CMB521, CMB522, CMB523, CMB524	Adaptation régions sub-optimales
CCGE14	Décembre 2009	8	CMB53, CMB86, CMB87, CMB89, CMB93, CMB526, CMB892, CMB893, CMB900	Adaptation régions sub-optimales
Monoclonal			CMB516, CMB517, CMB519, CMB522	Adaptation régions sub-optimales

2.5 Conservation des collections et des clones CMB

La collection de PEM comprend 356 accessions dont 104 proviennent de PMB. Pour les 252 accessions restantes, il faudrait vérifier si elles sont présentes sur PMB et éventuellement envisager des transferts pour celles qui seraient absentes sur PMB.

2.6 Conservation des données moléculaires à valeur ajoutée, CCPE9

Cet essai a été planté en mars 2006. Il est constitué d'une descendance PR255 x PB217 comprenant 277 génotypes. Cette descendance est en cours de cartographie à l'UNICAMP (Centre de Biologie et Ingénierie Génétique). L'UNICAMP est seule à détenir une banque d'ADN pour ce matériel.

Comme cet essai fait l'objet d'un travail important de phénotypage, il semble important de détenir un stock d'ADN pour chaque individu, accessible à chaque partenaire, d'autant que cette descendance est implantée en dehors de *Nova PEM* (CCPE9) et court le risque d'être éliminée par le nouveau propriétaire.

Pour constituer cette banque, des feuilles de chaque génotype (+ parents) pourront être envoyées à Montpellier pour extraction et constitution d'une banque d'ADN.

Une analyse des données phénotypiques disponibles est donnée en annexe.

2.7 Préparation des COV

En 2008, l'UPOV a validé un document technique pour les tests DHS pour l'*Hevea*, ouvrant la possibilité de protection des nouveaux clones d'*Hevea* par COV.

Ce sont 27 descripteurs morphologiques observés sur plantes immatures et sur arbres adultes nécessitant une planification de la période d'observation de façon à profiter des essais en place (principalement CCPE).

Au cours de la mission il a été montré comment on pouvait renseigner chacun des critères tout au long du processus de sélection. Ainsi, pour les critères 1 à 13, ceux-ci doivent être notés sur l'ensemble des génotypes présents dans le CCPE (arbres en phase juvénile non sélectionnés). De même, le critère 19 (forme de la couronne) doit être noté sur l'ensemble des clones au cours de la première année de saignée précoce de façon à faciliter son évaluation.

3. Réflexion sur une stratégie d'exploration des essais champs de PEM

Compte tenu du contexte de réduction d'activité de PEM et en faisant l'hypothèse d'une fermeture de l'activité recherche du programme d'amélioration, il peut être proposé différents scénarios d'évaluation des essais implantés sur PEM :

1. Réalisation de la saignée jusqu'à la fin de l'évaluation des CCPE en saignée précoce (2017).

Avantage : sélection des principaux clones CMB et transfert de ceux-ci vers une station d'accueil (à définir)

Inconvénient : peu d'information sur les données réelles de production.

Questions : quelle serait la station d'accueil? Dans ce scénario, doit-on poursuivre la saignée industrielle en CCPE ? Doit-on continuer à mettre en place des CCGE avec des clones CMB ?

2. Réalisation de la saignée jusqu'à la fin de l'évaluation des CCPE en saignée industrielle (2023)

Avantage : idem précédent + données consolidées de production pour l'ensemble des clones CMB sur des données de CCPE + récupération de clones exprimant leur potentiel de production tardivement sur l'ensemble des CCPE. Cela laisse aussi la possibilité d'explorer les potentiels de production des clones plantés sur les CCGE 7 à 14.

Questions : Station d'accueil des clones CMB? Doit-on poursuivre la mise en place d'autres CCGE avec les clones CMB ?

3. Réalisation de la saignée jusqu'à la fin de l'évaluation des CCGE (2037). Dans ce cas, le suivi des essais est réalisé jusqu'à la fin du processus de sélection passant par les phases d'évaluation en CCPE (saignée précoce + saignée industrielle) et en CCGE. Dans ce scénario, il devrait être implanté 10 CCGE supplémentaires.

Il faut souligner que le matériel végétal présent sur PEM comprend principalement des variétés créées et sélectionnées pour l'adaptation aux régions sub-optimales (représente donc seulement une partie du programme CMB). Ce matériel ne présente pas ou peu de résistance au SALB. En cas de transfert des clones CMB vers des collections, ce point devra être pris en considération.

II. Symposium Brésil - France de Bioinformatique (UESC, Ilhéus, Bahia)

Traduit de la carte d'intention rédigée par Ana Miranda Brasileiro (Embrapa), Pierre Marraccini (Cirad) ; CIBA comité opérationnel. Déc 2010.

Le symposium UESC, Brésil - France de bioinformatique s'est déroulé du 8 au 12 novembre 2010, à l'Université d'Etat de Santa Cruz (UESC, Ilhéus, Bahia - Brésil), organisé par le Centre en Biologie Informatique et Organisation d'Information Biotechnologique (NBCGIB). Ce symposium vient d'une initiative du Consortium International en Biologie Avancée (CIBA) qui a été créé entre l'Embrapa (pour le compte du réseau de recherche brésilien en agriculture) et Agropolis (pour le compte des institutions françaises de recherche et formation localisées à Montpellier-France) dans le but de développer et soutenir une stratégie efficace de coopération internationale en recherche et formation limitées au champ de la biologie avancée appliquée à l'amélioration des plantes.

Ce symposium a été le résultat d'efforts concertés entre des chercheurs d'institutions françaises et brésiliennes qui ont identifié la bioinformatique comme un champ de recherche essentiel pour conduire leurs propres projets de recherche. L'objectif est de souligner le besoin de formation de chercheurs au regard de la gestion et l'utilisation de l'énorme quantité de données provenant des projets de séquençage des génomes, particulièrement ceux provenant des technologies *Next-Generation Sequencing (NGS)*, et discuter les avancées récentes en analyse bioinformatique de données provenant de la génomique, transcriptomique et protéomique.

Ce symposium a été coordonné conjointement par le Dr. Esbel T Valero Orellana (UESC) et Fabienne Micheli (Cirad-UESC) avec l'aide d'une commission d'organisation composée de 8 chercheurs de différentes institutions. Le symposium était organisé en deux sessions, avec des présentations théoriques le matin (limitées à 100 personnes) et des cours pratiques l'après-midi (limités à 40 personnes). Compte tenu de l'importance de la biologie avancée dans les deux pays, ce symposium a essayé de rassembler quelques partenaires clés au Brésil et en France dans les champs de la bioinformatique appliquée à l'amélioration des plantes et des animaux dans un exercice de partage mutuel de connaissances et d'expériences.

Ce congrès a reçu l'appui financier et logistique de *UESC, CIRAD, Embrapa, CAPES CNPq, CEPLAC, LNCC, Brazilian Coffee Consortium, Ambassade de France au Brésil* ainsi que de compagnies privées comme *Michelin, Mars* (Center for Cocoa Science) et *Caixa Seguros*.

Parallèlement au symposium, une réunion CIBA regroupant 18 chercheurs Français et Brésiliens a eu lieu afin de discuter du suivi des projets et des futurs partenariats, des projets communs et des initiatives intéressant les équipes de recherche en bioinformatique en France et au Brésil.

Comme préambule, les institutions de recherches du CIBA au sens large, du côté français comme du côté brésilien, ont nouvellement manifesté leur intérêt pour la thématique bioinformatique. Les participants ont souligné la pertinence du symposium pour (a) rapprocher les interactions scientifiques entre les équipes de bioinformatique de la France et du Brésil impliquées dans la gestion, l'utilisation et l'analyse de données biologiques concernant les plantes tropicales dans le réseau CIBA (comme le cacaoyer, le riz, le coton, le caféier, l'hévéa, *Arachis*, le bananier...); (b) partager les expériences et les protocoles pour

développer et assembler des pipelines et (c) offrir de la formation en bioinformatique aux étudiants (à tous les niveaux du programme), aux post-doctorants, aux chercheurs (utilisateurs des outils bioinformatiques) et bioinformaticiens.

Trois points principaux ont retenu l'attention des participants au meeting CIBA :

1- La bioinformatique est un champ interdisciplinaire, en permanente évolution particulièrement au regard des outils qui sont nécessaires pour stocker, gérer, analyser et caractériser l'énorme et continu flux de données de séquençage produit par les techniques *NGS*. La bioinformatique est aussi coûteuse en temps et le nombre de laboratoires et de chercheurs spécialisés dans ce domaine sont limités au regard du nombre de données à traiter.

2- Il y a un besoin de former en outils bioinformatiques les chercheurs travaillant en biologie moléculaire ce qui leur permettra un accès, une gestion et une analyse facilités des bases de données ADN et protéiques existantes. Par l'acquisition des connaissances basiques en bioinformatique, ces biologistes seront plus autonomes pour organiser et utiliser un grand nombre de données dans leur propre projet de recherche.

3- Même si plusieurs formations en bioinformatique existent au Brésil et en France avant et pendant la « graduation » (équivalent master I), il y a un important déficit de professionnels travaillant dans ce domaine dans les deux pays.

Vue l'accélération de l'évolution des techniques de séquençage, l'arrivée massive des données de séquences et le nombre limité d'équipes de bioinformaticiens, il y a un besoin impératif de partager des outils communs (programmes) et des plateformes (quand elle sont déjà disponibles) entre laboratoires et chercheurs avec pour objectif d'accélérer leur analyses. Le partenariat stimulera les travaux de laboratoire pour travailler d'une façon étroite et synergique, en réduisant les risques d'embouteillage dans le traitement des données biologiques. Quelques initiatives de partenariat existent entre le Brésil et la France, mais sont considérées comme ponctuelles et méritent d'être développées et intensifiées afin de promouvoir la mobilité des étudiants et des chercheurs et la formation en bioinformatique.

Ces actions font partie du mandat du CIBA et peuvent être atteintes par :

1- L'organisation régulière (annuelle) de congrès en bioinformatique, en utilisant comme modèle le congrès CIBA-2010 qui vient d'être réalisé à l'UESC,

2- L'établissement d'actions concertées pour soutenir des formations bilatérales de techniciens, étudiants et chercheurs dans les laboratoires de bioinformatique concernés,

3- Promouvoir la construction d'un réseau bilatéral et international en Bioinformatique,

4- Améliorer la mobilité et le potentiel des bioinformaticiens.

Ces actions, qui ont déjà reçu le soutien de l'Embrapa et du Cirad, peuvent aussi être appuyées par les chercheurs impliqués avec l'appui de leurs respectives institutions et d'une façon concertée entre les équipes brésiliennes et françaises en déposant des projets aux appels d'offre des agences de financement existantes dans les deux pays.

III. Comité de pilotage du projet transcriptome *Hevea* (FMRP/USP; Ribeirão Preto, São Paulo)

Projeto CNPq – PROSUL

Título : Transcriptoma da *Hevea brasiliensis*

Do dia 16/11 até 20/11/2010: Visita do Dr. Dominique GARCIA (CIRAD) e Xavier ARGOUT (CIRAD)

19/11/2010 : Comitê técnico do projeto

Presente: Xavier ARGOUT (CIRAD), Dominique GARCIA (CIRAD), Luis Gonzaga Paula de ALMEIDA (LNCC), Israel (FMRP/USP), Daniel Guariz PINHEIRO (FMRP/USP), Leonardo Rippel SALGADO (FMRP/USP), Wilson Araújo de Sousa Jr. (FMRP/USP)

Ausente : Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos (LNCC), Marisa Fabiana Nicolás (LNCC), Antonio Vargas de Oliveira Figueira (SENA), Luiz Lehmann Coutinho (ESALQ), Maristerra Rodrigues Lemes

Resumo

A heveicultura é quase a única fonte de produção de borracha natural (látex), um biopolímero insubstituível e estratégico para diferentes setores da indústria. No contexto nacional e internacional, o aumento da produção da borracha natural passa pelo combate aos problemas climáticos e de resistência a pragas. Na lista das ferramentas biotecnológicas que podem vencer tais desafios, destaca-se o estudo do genoma da *Hevea*, oferecendo meios para identificar genes que regulam as etapas do desenvolvimento da planta, as respostas aos estresses bióticos e bioagressores, a produção de látex. No Brasil, este projeto visa a traves do uso da plataforma **454 GS FLX**, sequenciar o transcriptoma da seringueira e identificar genes ligados a tolerância a estresses bióticos, abióticos e a produção do látex.

Após os 11 primeiros meses do projeto, o piloto de sequenciamento de cDNA (primeiro no Brasil com a tecnologia 454 GS FLX) realizado a partir de diferentes órgãos da cultivar RRIM600 permitiu estabelecer um protocolo experimental da coleta do material até o tratamento bioinformático dos dados. Novas metas a curto prazo foram definidas de forma a gerar as informações necessárias para produzir um primeiro artigo científico.

1. Material e Métodos

1.1. Preparo do material vegetal e conservação das amostras

Em plantas adultas do clone RRIM600 foram coletadas amostras de órgãos e tecidos distintos na Plantação E. Michelin (Itiquira, MT, Brasil): frutas em diversos estágios de desenvolvimento, pedúnculo, flores masculinas e femininas maduras e imaturas, casca e látex. As amostras foram conservadas no RNA*later* (QIAGEN) à 8°C para serem transportadas até a UESC (Ilhéus, BA).

Na plantação Michelin da Bahia (Ituberá, BA, Brasil), foram coletados, em plantas adultas, casca e látex, e em plantas enxertadas com dois lançamentos, folíolos nos estágios A, B, C e D, pecíolos, pecíolulos, caule lignificado e verde, e órgãos de sementes germinadas em diferentes estágios de desenvolvimento. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e transportadas à UESC para conservação a -80°C.

1.2. Extração do RNA

O RNA foi extraído com Cloreto de Césio a partir de 1g de matéria fresca de cada amostra segundo o protocolo de Morcillo *et al.* (2006), no Centro de Biotecnologia e Genética (UESC) e os extratos enviados ao LNCC. Para analisar a qualidade e a quantidade do RNA, foram realizadas eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio e análise da $DO_{260/280}$, na UESC. No LNCC, os extratos foram quantificados com o Bioanalyser Agilent 2100.

A partir desses extratos, foram realizados dois mixes. O primeiro inclui os extratos extraídos dos materiais clonais. O segundo agrupa os extratos dos materiais oriundos de cruzamento com RRIM600 (flores femininas, sementes imaturas e sementes germinadas).

Os mixes foram enriquecidos em RNAm com o *PolyATtract mRNA system* (Promega) de forma a se obter uma concentração final superior a 10 ng/μl de RNAm.

1.3. Construção da biblioteca de cDNA

Para síntese do cDNA foi utilizado o kit *cDNA Rapid Library Preparation* seguindo as recomendações do fabricante (Roche). O preparo das amostras envolve a fragmentação do RNAm com cloreto de zinco. Em seguida, a partir dos fragmentos de RNA, *random Primer* são utilizados para sintetizar o cDNA. No cDNA adaptadores RL MID são ligados e pequenos fragmentos são retirados com *AMP beads* de forma a obter fragmentos de cDNA entre 600 e 1200bp. Após desnaturação, em torno de 10^8 moléculas de cDNA são preparadas para serem amplificadas em emulsão (em PCR). O material é novamente enriquecido e desnaturado para iniciar o sequenciamento.

1.4. Sequenciamento 454

O sequenciamento das ESTs é realizado no sequenciador 454 GS FLX que tem a capacidade de sequenciar de 100 a 500 milhões de pares de bases de DNA, gerando fragmentos entre 250 a 450 pb de comprimento. A técnica usada é a do pirosequenciamento.

1.5. Análise bioinformática dos dados

1.5.1. Pre-processamento dos dados

Uma corrida 454 com duas regiões produz, em média, 500 Mbp e 1 milhão de leituras. O processamento completo desses dados não é possível de ser realizado no sequenciador 454 *in loco*, apenas pode-se realizar o processamento das imagens. O processamento de imagens gera um arquivo de 25 Gb, esta etapa transforma os arquivos de imagens de extensão “pif” em arquivos extensão “cwf”. O processamento seguinte do sinal gera os fluorogramas, transformando os arquivos “cwf” em arquivos standard *flowgram files* “sff” além de arquivos de qualidade e arquivos fasta. O processamento do sinal esta realizado em um cluster SunFire X4600 8 X Dual Core AMD Opteron com 64 Gb RAM.

1.5.2. Processamento dos dados

A partir dos arquivos gerados do processamento do sinal, o CIRAD, a FMRP e o LNCC executaram respectivamente diferentes pipelines de trimming e montagem dos reads em contigs (Tab. 2) : ESTtik (TGICL), EST2assembly (MIRA), Newbler 2.3.

1.5.3. Anotação

Os contigs resultandos da assemblagem com TGICL foram comparados às sequencias contidas no *Arabidopsis* reference proteome; Swissprot eEMBL, NR GenBank e NT. O arquivo de anotação resultando foi exportado no GeneOntology para definir grupos funcionais de genes.

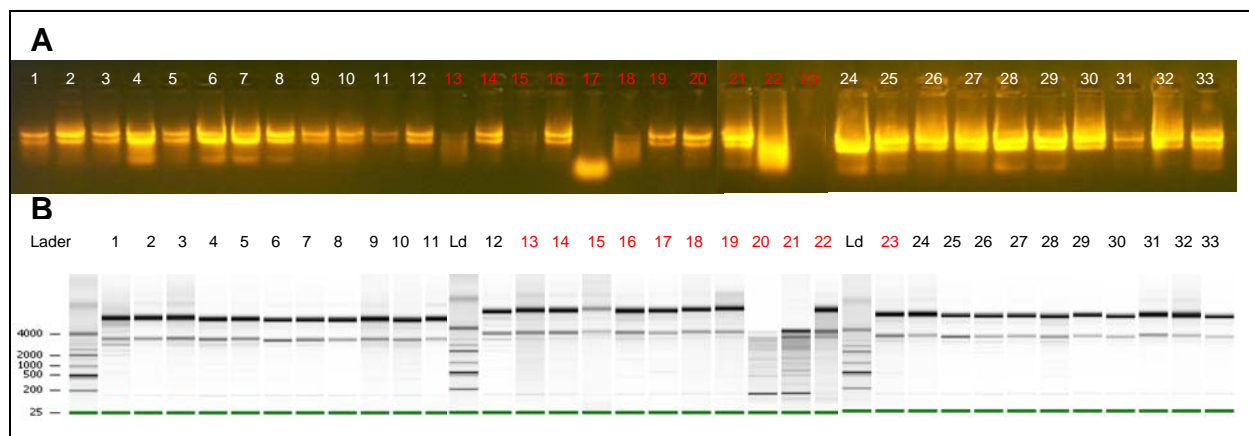
2. Resultados e Discussão

2.1. Conservação das amostras

As distâncias entre as áreas de amostragem e o laboratório onde são processadas as amostras variam neste estudo entre 150km e 3.000km, necessitando diferentes meios de transportes (via aérea ou terrestre), e métodos de conservações, sendo que o transporte de nitrogênio líquido não é autorizado pelas companhias aéreas. Dentro dos produtos disponíveis no mercado, foi testado o *RNAlater* (QIAGEN). A figura 3-A indica que apesar de algumas amostras estarem degradadas (17 – semente imatura com albúmen transparente) e duas parcialmente degradadas (13 – racemo; 18 – casca do tronco), pode se supor que isso ocorreu principalmente no processo de migração, já que na quantificação no Bioanalyzer Agilent 2100 essas 3 amostras aparecem íntegras (Fig 3-B). No Bioanalyzer, somente as amostras 20 e 21 apresentam um perfil de migração com RNA degradado. A maioria contém um perfil de migração correto: duas bandas ribossomais com uma razão 28S/18S superior a 2 (Tabela 1). Em consequência, o *RNAlater* representa uma alternativa para transportar os tecidos/órgãos por via aérea de locais afastados, onde o material é coletado, até o laboratório, evitando a degradação do RNA. Para o transporte dos extratos de RNA do laboratório de extração até o centro de sequenciamento (neste caso da UESC, Ilhéus, BA até o LNCC, Petrópolis, RJ), a conservação do extrato em etanol 70% foi eficaz.

Figura 1: Extratos de RNA de órgãos e tecidos do cultivar RRIM600 extraído por ultracentrifugação com cloreto de cério. (A) Revelação em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio; (B) Quantificação no Bioanalyzer Agilent 2100.

1: Foliolos estágio D; 2: Foliolos estágio A ; 3: Pecíolos de folhas estágio D; 4: Pecíolo de folíolo estágio D; 5: Caule lignificado; 6: Folíolo estágio B2; 7: Pecíolo de folhas estágio B2; 8: Meristema apical; 9 e 10: Casca de tronco RRIM600 enxertado de copa com MDF180; 11: Látex do RRIM600 enxertado de copa com MDF180; 12: Folíolo estágio C; 13: Racemo; 14: Semente imatura com tegumento branco; 15: Semente imatura com tegumento amarelado; 16: Pedúnculo; 17: Semente imatura com albúmen transparente; 18 e 19: Casca de tronco de RRIM600 (enxertia simple); 20: Flores macho maduras e imaturas; 21: Flores fêmeas fecundadas; 22: Colunas e paredes dos lobos da fruta; 23: Casca da fruta; 24, 25, 26, 27: Folhas, caule, raízes e semente de plântulas no estágio de desenvolvimento D; 28, 29, 30: Caulículo, raízes, e semente de plântulas no estágio de desenvolvimento C; 31: Semente germinada no estágio de desenvolvimento B; 32: Cotilédone de semente germinada estágio de desenvolvimento A; 33: Albúmen de semente germinada estágio de desenvolvimento A



2.2. Quantidade e qualidade do RNA

Na literatura, a quantidade de RNAm nos tecidos varia entre 1 e 5% do RNA total. Para se usar o kit *cDNA Rapid Library Preparation* (Roche), são necessários 200 ng de RNA enriquecido em RNAm, representando entre 4 e 20 µg de RNA total. Na tabela 1, observa-se que, na maioria dos tecidos, as quantidades obtidas de RNA total são suficientes para criar uma biblioteca de cDNA de cada tecido/órgão a partir de 1g de matéria fresca.

As amostras apresentam uma $DO_{260/280}$ entre 1.5 e 1.8 indicando que alguns extratos de RNA não são completamente puros (valores recomendados entre 1.7 e 2.1). Por tanto, a etapa seguinte de enriquecimento em RNAm com *PolyAtract mRNA Isolation Systems* (Promega), permite a purificação, além de concentrar o extrato em RNAm.

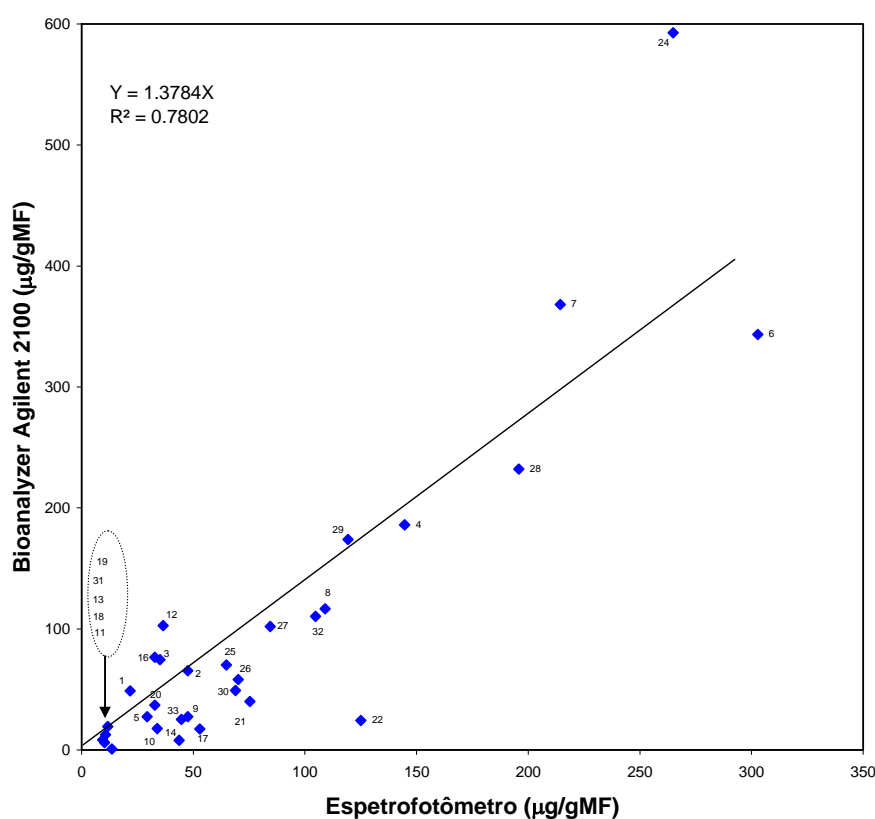
Apesar de ter uma subestimação na quantificação do RNA total por espectrofotometria comparado ao Bioanalyzer Agilent 2100 (Fig. 2), as etapas de dosagem dos extratos, preparação dos mixes de população de RNAtotal e enriquecimento em RNAm, podem ser realizadas na UESC. Neste caso, os extratos enriquecidos em RNAm seriam enviados ao LNCC.

Tabela 1: Quantificação dos extratos de RNA total de diferentes órgãos e tecidos de seringueira (Bioanalyzer Agilent 2100 e espectrofotômetro).

Órgãos e tecidos	Agilent 2100 µg/gMF	DO 260/280	Razão RNAr 28S/18S
8. Meristema apical	116.7	1.6	3.0
2. Folíolo estágio A	65.5	1.6	3.3
6. Folíolo estágio B2	343.5	1.7	1.8
12. Folíolo estágio C	102.7	1.5	2.7
1. Folíolo estágio D	48.7	1.6	2.5
7. Pecíolo de folhas estágio B2	368.1	1.6	2.1
3. Pecíolo de folhas estágio D	74.5	1.8	2.7
4. Pecíolulos de folíolos estágio D	186.1	1.6	2.7
5. Caule lignificado	27.5	1.6	3.0
9. Casca de tronco RRIM600 enxertado de copa com MDF180 (BA)	27.5	1.6	3.1
10. Casca de tronco RRIM600 enxertado de copa com MDF180 (BA)	17.7	1.6	3.1
18. Casca do tronco (MT)	0.8	1.6	2.1
19. Casca do tronco (MT)	19.3	1.8	2.8
11. Látex	6.0	1.6	4.1
13. Racemo	8.4	1.8	2.9
20. Flores femininas e masculinas imaturas	40.9	1.5	3.5

17. Semente imatura com albúmen transparente	17.2	1.7	2.2
14. Semente imatura com tegumento branco	8.0	1.5	-
15. Semente imatura com tegumento amarelado	59.4	2	3.1
22. Colunas e paredes dos lobos da fruta	24.2	1.6	3.3
23. Casca da fruta	29.2	2	3.4
16. Pedúnculo	76.7	1.6	2.8
32. Cotilédone de semente no estágio de desenvolvimento A	110.3	1.7	4.7
33. Albúmen de semente no estágio de desenvolvimento A	25.3	1.5	-
31. Semente germinada de plântulas no estágio de desenvolvimento B	12.5	1.7	5.3
28. Caulículo de plântulas no estágio de desenvolvimento C	232.2	1.6	3.7
29. Raízes de plântulas no estágio de desenvolvimento C	173.9	1.6	3.7
30. Semente de plântulas no estágio de desenvolvimento C	49.2	1.7	3.3
24. Folhas de plântulas no estágio de desenvolvimento D	592.7	1.6	1.6
25. Caule de plântulas no estágio de desenvolvimento D	70.2	1.5	3.5
26. Raízes de plântulas no estágio de desenvolvimento D	58.2	1.6	3.4
27. Semente de plântulas no estágio de desenvolvimento D	102.1	1.6	3.3

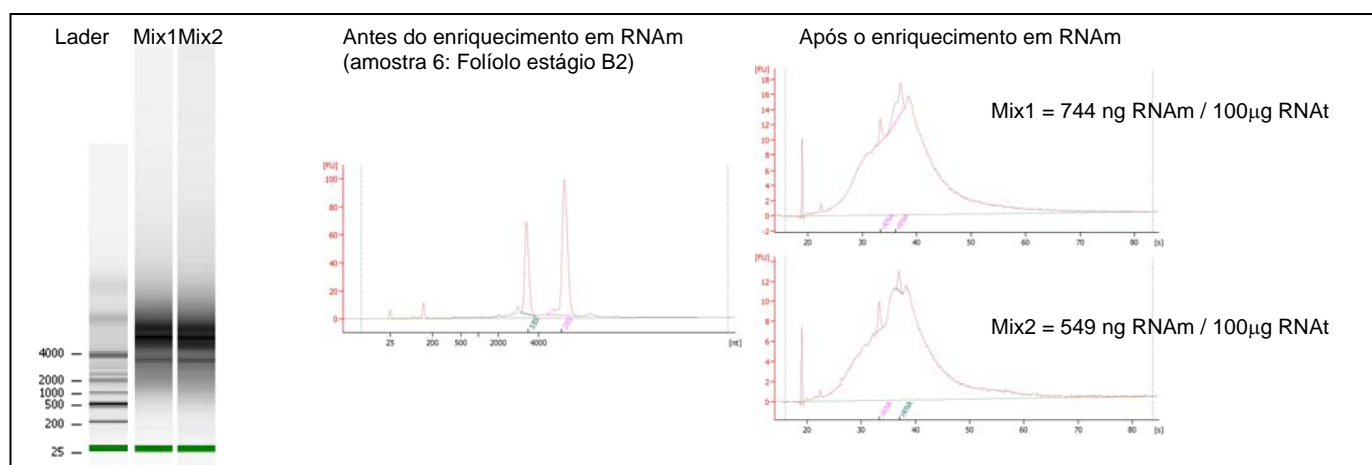
Figura 2: Relação entre a quantificação dos extratos de RNA total por espectrofotometria e pelo Bioanalyzer Agilent 2100.



2.3. Enriquecimento em RNAm

Para evitar o sequenciamento do RNA ribossômico (95 a 99% do RNA total), uma etapa de enriquecimento em RNAm é necessária. Por isso, foi utilizado o kit *PolyATtract mRNA* (Promega). Dessa forma a partir do mix de 100µg de RNA total, conseguimos recuperar para o primeiro e segundo mix, 744ng e 548ng de RNA enriquecido em RNAm, respectivamente (Fig. 3).

Figura 3: Quantificação dos mix após enriquecimento em RNAm com o *PolyAtract mRNA Isolation Systems* (Promega).



2.4. Métrica do primeiro run de sequenciamento 454 GS FLX

Pela técnica 454 GS FLX, foram sequenciados a partir de uma corrida 218.680.000 pares de bases de cDNA representando 578.849 reads com tamanho médio de 377 pares de bases.

No pre-processamento e montagem com ESTtik e EST2assembly pipeline, os reads obtidos dos Mix1 e Mix2 foram analisados juntamente. Após eliminação dos reads os mais curtos, dos reads não codificantes (tRNA e rRNA), dos homopolímeros (PolyA/T), dos reads com regiões repetidas, foram obtidos números comparáveis de reads finais : 377.360 com ESTtik e 360.219 com EST2 assembler (Tab. 2)

Tem que ressaltar que o número de reads com homologia com rRNA foi importante : 177.421 rRNA com ESTtik e 124.416 rRNA com EST2assembler representando em torno de **20 a 30% dos reads iniciais**. Esse valor alto sugere-nos mudar a técnica de enriquecimento usando oligo(dT) primer para síntese da primeira fita de cDNA (Smart cDNA library construction, Clontech) em vez de utilizar os kits de enriquecimento em mRNA (PolyAtract mRNA, Promega) e a síntese de cDNA com random primers (Roche).

Após a montagem *de novo*, números comparáveis de contigs foram obtidos com os dois softwares : 34.572 com TGICL e 31.647 com MIRA. O número de singleton foi bem maior com TGICL indicando diferenças na montagem dos contigs entre TGICL e MIRA.

Na montagem com Newbler 2.3, os reads oriundos dos materiais clonais e dos materiais híbridos foram analisados separadamente. Foram obtidos 8.209 e 10.830 transcritos com tamanhos próximos de 1000 pb. A comparação de diferentes softwares de montagem CAP3, MIRA, SeqMan, CLC, Newbler 2.3 e 2.5 (Blaxter *et al.*, 2010, BMC Genomics), indicou que Newbler 2.3 gerava contigs de tamanho inferior. Nas próximas análises a versão 2.5 será utilizada.

Tabela 2: Dados estatísticos preliminares comparando 3 programas de montagem TGICL, MIRA e NEWBLER 2.3.

	CIRAD (ESTtik pipeline, CIRAD)	FMRP/USP (EST2assembly pipeline*)	LNCC
Reads iniciais	578.849	578.849	Mix 1: 253.102 Mix 2: 325.639
Trimming (reads)	377.360 (a) (177.421 rRNA)	360.219 (b) (124.416 rRNA)	Mix1: 155.354 Mix2: 207.972
Programa de assemblagem	TGICL	MIRA	NEWBLER 2.3
Contigs	34.572	31.647	Mix1 (isotig): 8.209 Mix2 (isotig): 10.830
Singletons	165.000	77.964	Mix1: 49.473 Mix2: 66.542
Contigs sem fragmento de sequencia repetida		22.246 9.401	
Contigs com fragmento de sequencia repetida			

* <http://code.google.com/p/est2assembly/>

(a) Eliminação dos reads <120pb, dos reads não codificantes tRNA e rRNA (199.576), dos homopolímeros (PolyA/T,...); dos reads com regiões repetidas

(b) Elimination of reads <40pb, adaptor 454; rRNA (124.416 rRNA), dos homopolímeros (Poly A/T,...); das reads com regiões repetidas (93.758 reads).

2.5. Anotação

As sequências dos contigs obtidos com TGICL, foram comparadas com o proteoma de referência de *Arabidopsis thaliana*, SwissProt, EMBL, NR GenBank e NT. Dos 34.572 contigs obtidos 32.834 foram anotados (95%). Apenas para 5% dos contigs não foi encontrada homologia de sequências. Enfim, 199.576 reads representam non-coding RNA incluindo 22.155 reads de tRNA e 177.421 reads de rRNA (Tab. 3).

O arquivo de anotação obtido foi transferido para Gene Ontology, para determinar o número de sequências por grupos funcionais (Fig. 4). Entre os grupos funcionais maiores encontram-se os que estão associados ao processo metabólico celular (7.846), metabolismo primário (7.004), processo metabólico de macromoléculas (5.532), processo de biosíntese (2996), processo metabólico de pequenas moléculas (2138). O número de contigs associados ao estresse é de 1681: 528 são classificados no grupo dos genes de resposta a estresses abióticos e 204 as respostas a estresses bióticos (Fig. 5).

Tabela 3: Resultado do BLAST usando os dados de assemblagem (TGICL) vs *Arabidopsis* reference proteome; Swissprot e EMBL, NR GenBank e NT.

Hit	32.834 contigs
-----	----------------

Non-coding RNA	199.576 reads <i>Include 177.421 reads rRNA : 30% reads!!!</i>
No hit	1.738 contigs (10 blast with A. Tha proteome, but no with other ref.)

Figura 4: GO analyse (biological process, level 3) usando todos contigs do pipeline ESTtik (Kegg representação)

biological_process Level 3

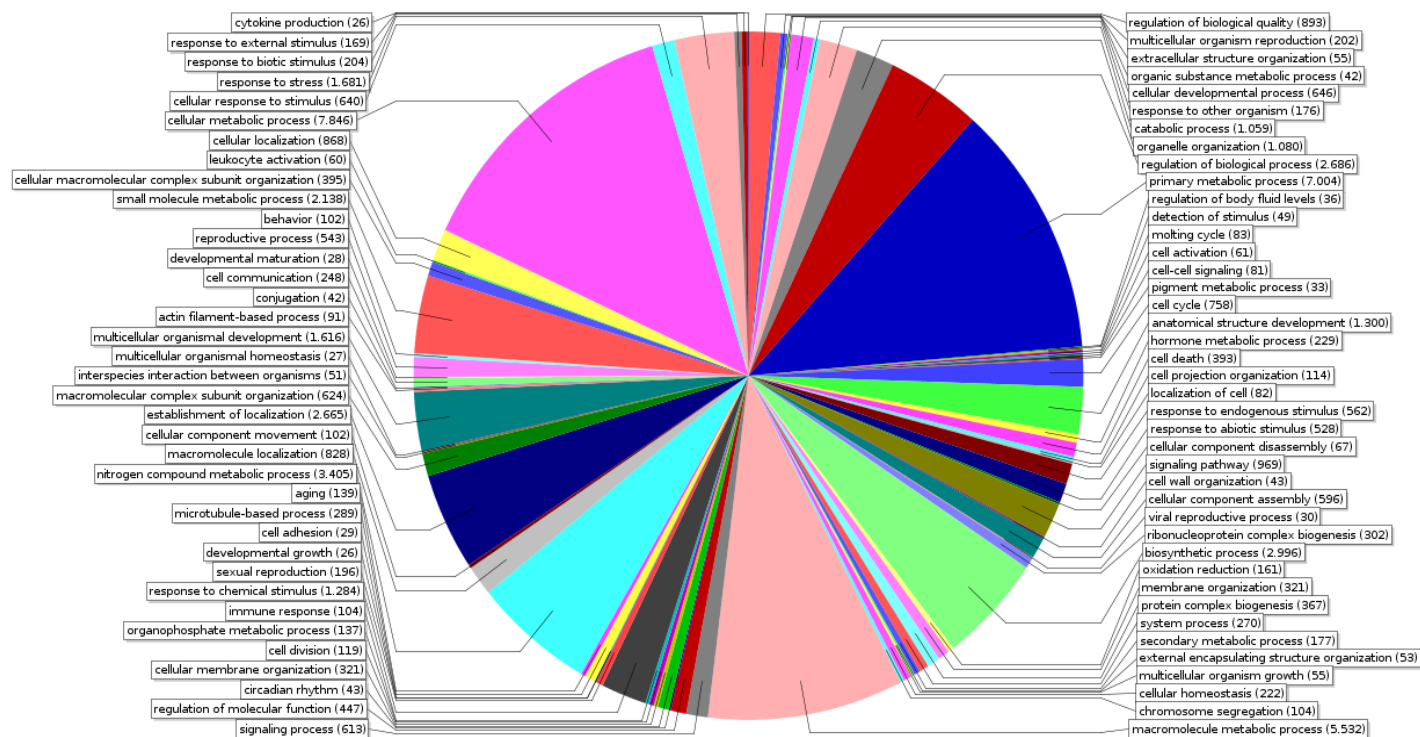
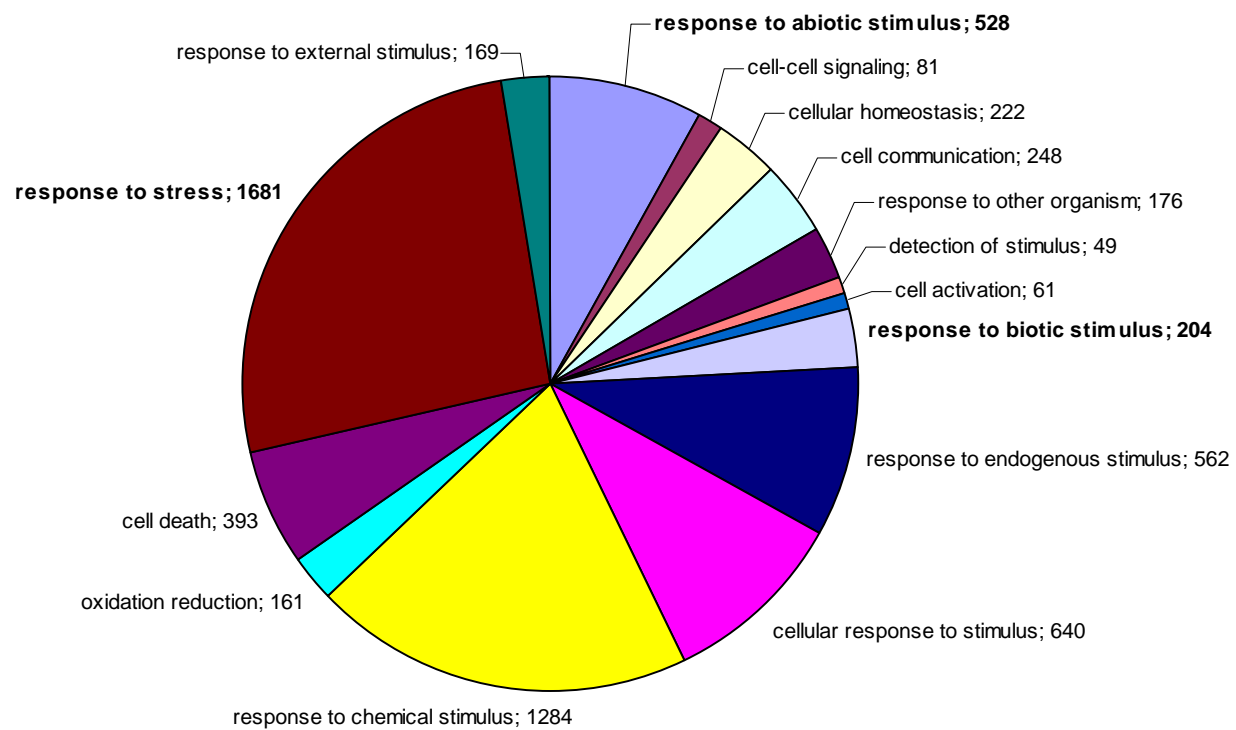


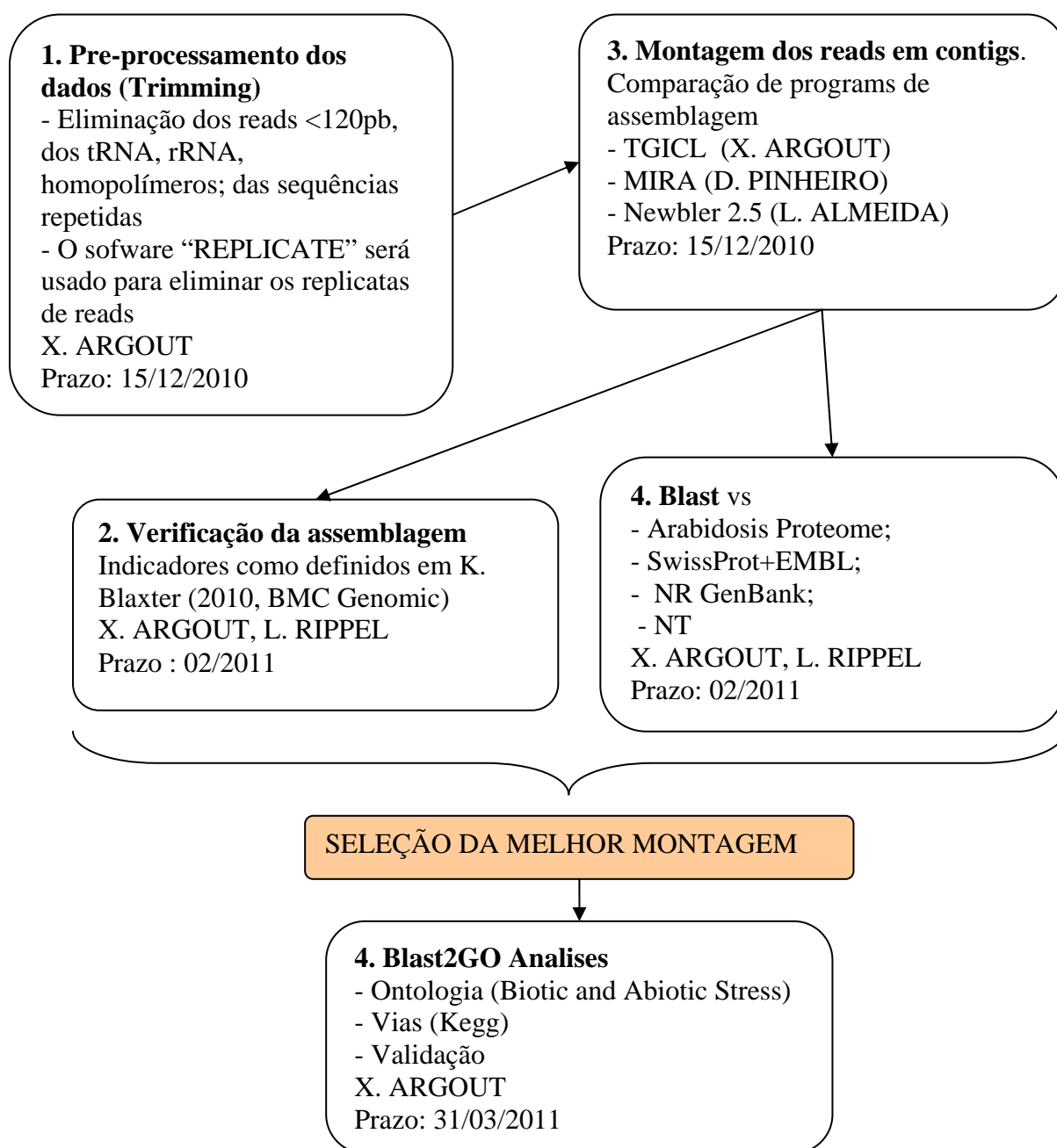
Figura 5: Grupos funcionais identificados por GO associados com resposta a estresses bióticos e abióticos.



3. Conclusão e perspectivas

- Este piloto permitiu definir as condições de sequenciamento e de anotação do transcriptoma por 454 de diferentes materiais do genótipo RRIM600. Algumas mudanças no protocolo de síntese do cDNA serão feitas nas etapas de enriquecimento e síntese do cDNA. Os kits *PolyAtract mRNA Isolation Systems* (Promega) e *cDNA Rapid Library Preparation* (Roche) serão substituídos pelo kit *Smart cDNA Library Construction* (Clontech).

- Um organigrama foi definido a seguir para produzir as informações necessárias a publicação de um primeiro artigo com os dados de sequenciamento 454 de cDNA de *Hevea*.



- Oito genótipos de seringueira com níveis diferentes de resistência ao Mal-das-Folhas foram infectados em condições controladas na Plantação Michelin da Bahia. As folhas foram coletadas, 24, 48, 96, 128 e 240 hpi. Folhas sadias foram também coletadas para cada tempo. Esta segunda corrida no 454 será feita com tags diferentes para cada biblioteca de cDNA de forma a comparar ao nível quantitativo os transcritos e identificar SNPs em cada contig.
- O material vegetal de três genótipos (RRIM600, PB260 e PR255) está sendo induzido por choque térmico (4°C) de forma a isolar genes relacionados com a resposta ao frio.
- Próxima reunião de avaliação do projeto : Abril 2011.

4. Trabalhos produzidos

Koop D.M., Rocha V.R., Magalhães M., Gerber A.L., Cascardo J.C.M., Vasconcelos A.T.R., de Almeida L.G.P., Nicolás M.F., Figueira A.V.O., Coutinho L.L., da Silva Jr. W.A., Garcia D. 2010. Pirosequenciamento do transcriptoma da seringueira. IIº Congresso brasileiro sobre heveicultura, 10-13 agosto 2010. Ilhéus, Bahia, Brasil.

Nicolás F.N. 2010. “Novas tecnologias em sequenciamento e análise de DNA de larga escala” Sequenciamento de alto desempenho na Unidade Genômica Computacional (UGC/LNCC). [Communication]. UNITIG2010. Porto Alegre, Août 2010.

ANNEXE1 : Observations et analyses des essais sur *nova PEM*

Pollinisations 2010

Pas de pollinisations en 2010.

Pour les prochaines années, aucune pollinisation n'est prévue.

CES1

Objectif : Essai méthodologique pour l'identification de clones slow starter en CES.

Méthodologie : mesure des productions individuelles (1 arbre = 1 génotype) sans stimulation pendant 3 mois, suivie de mesures de production (3mois) après stimulation sur des arbres dont la circonférence est supérieure à 40 cm. Accompagnement avec des mesures de DL individuel avant stimulation.

Questions :

- Est-ce qu'1 DL sur 1 arbre est suffisant pour évaluer la typologie du métabolisme du génotype?
- Est-ce que la réponse à une stimulation permet de détecter des clones slow starter sur un délai aussi court qu'une évaluation de la production au cours de 3 mois?

Dans cet essai, il serait peut-être plus intéressant de comparer les moyennes familiales plutôt que les valeurs individuelles. Dans le cas d'effets importants famille par rapport aux effets individuels, il serait plus opportun de sélectionner une/des familles avec des critères correspondants à un métabolisme de slow starter (à définir).

CCPE 3

Rappels :

- Champ comparatif de clones planté en janvier 1999 ;
- 1^{ère} saignée précoce (arbres avec une circonférence \geq à 25 cm) de décembre 2004 à août 2005 ;
- 2^{ième} saignée précoce de nov.2005 à juin 2006 ;
- Saignée seulement sur 14 clones CMB sélectionnés de septembre 2008 à juillet 2009 ;
- Saignée de tous les arbres dont la circonférence était supérieure ou égale à 45cm de septembre 2009 à juin 2010.

Résultats de l'analyse des données de production 2009-2010:

- En 2009-2010, seuls trois clones CMB présentent des productions supérieures à GT1 et PR255 : CMB521, CMB527 et CMB518.
- Suite à la saignée 2009-2010, 9 clones pourraient être récupérés dans ce CCPE pour leur production : 50, 7, 32, 64, 42, 79, 55, 58, 85. Après observation des arbres au champ, seuls les clones n°50, 64, 7 et 42 méritent d'être retenus. Les clones 32, 79, 55, 58 et 85 présentent des déséquilibres de couronnes préjudiciables au bon développement de l'arbre.

Clone n°32 : arbre filant, peu de branche, feuilles sur l'extrémité des branches (plumeau), fort élagage naturel.

Clone n°79 : Arbre filant, élagage naturel fort, bonne densité foliaire, meilleur profil dans la répétition 3.

Clone n°85 : Arbre filant, élagage naturel fort, bonne croissance sur répétition 3.

Clone n°58 : Beaucoup de casse au vent sur plusieurs répétitions, feuillage lourd sur les extrémités de branches, branchage fin.

Clone n°55 : Arbre filant, peu de ramification secondaire (aspect plumeau).

Clone n°50 : Bonne ramification, bonne densité foliaire, par contre nombreux arbres manquant dans répétition 1 et 2 (problème d'adaptation en période immature?)

Clone n°64: Arbre filant, toutefois bonne ramification secondaire, bonne densité foliaire.

Clone n°7: Très belle couronne foliaire, feuilles dans toutes les strates, arbre non filant, faible élagage naturel

Clone n°42: Arbre avec une ramification basse (très faible élagage naturel). Très bonne densité foliaire, toutefois peu d'arbres sur toutes les répétitions (problème d'adaptation en période immature ?)

Par ailleurs, les clones n°27 et 81 présentent les meilleures croissances comparativement aux autres clones (2 premiers en croissance sur l'essai). Leur production est moyenne (niveau du PR255). Cela en fait toutefois de bons candidats à la sélection pour leur vigueur en région sub-optimale.

En conclusion dans ce CCPE, 14 clones ont été proposés sur des données de croissance et de production (2004-2006) pour être évalués en CCGE. Douze d'entre eux sont déjà implantés dans ces CCGE. Au regard des données 2009-2010, 7 d'entre eux présentent un comportement moyen en production et en croissance. Enfin, 6 clones pourraient être récupérés pour leur production et leur vigueur.

Pour les 6 clones récupérés, on peut proposer avant de leur attribuer un n° CMB, de poursuivre leur observation en production.

- A faire pour les COV : Analyser les caractéristiques *intensité de la défoliation hivernale* (n°22), *début de défoliation* (n°23) en 2011 seulement sur les clones sélectionnés.

Clone (n°CCPE)	n° CMB	Famille	Croissance 2010 (cm)	n° classement / 88 clones	Production 2010 (g CS/arb.saig)	n° Classement / 85	Monoclonal CCGE
63	CMB52	PR255 x IRCA519	49	63	19	49	-
53	CMB53	PR255 x IRCA519	47	40	18	55	CCGE14
89	CMB516	PR255 x FX3864	50	64	24	23	Monoclonal CCGE13
25	CMB517	PB260 x FX3864	48	68	18	57	Mono clonal CCGE13
68	CMB518	PR255 x IRCA519	53	32	26	16	CCGE13
80	CMB519	GT1 x FX3864	53	20	21	36	Monoclonal CCGE13
35	CMB520	GT1 x FX3864	48	71	24	22	CCGE13
8	CMB521	PR255 x IRCA621	53	35	29	9	CCGE13
86	CMB522	PR255 x FX3864	50	58	24	25	Monoclonal CCGE13
49	CMB523	PR255 x IRCA519	50	60	18	58	CCGE13
65	CMB524	PR255 x IRCA519	51	51	17	60	CCGE13
59	CMB525	GT1 x IRCA621	51	52	16	67	-
84	CMB526	PR255 x FX3864	49	61	14	74	CCGE14
91	CMB527	GT1 x IRCA621			27	11	CCGE15
50		PR255 x IRCA519	53	76	37	1	
64		PR255 x FX3864	51	11	34	3	
7		PR255 x FX3864	51	49	29	6	
42		GT1 x FX3864	52	45	33	4	

27		XX701 x FX3864	62	2	21	38	
81		XX701 x IRCA621	62	1	23	28	

Figure 1 : Comparaison des productions clonales (exprimées en g CS/arbre.saignée) 2005-2006 (2^{ème} tour de saignée précoce) et 2009-2010 (saignée industrielle). Les clones CMB sélectionnés après le deuxième tour de saignée sont indiqués et 9 clones supplémentaires sont indiqués suite à la saignée 2009-2010 (groupe de clones entourés de pointillés).

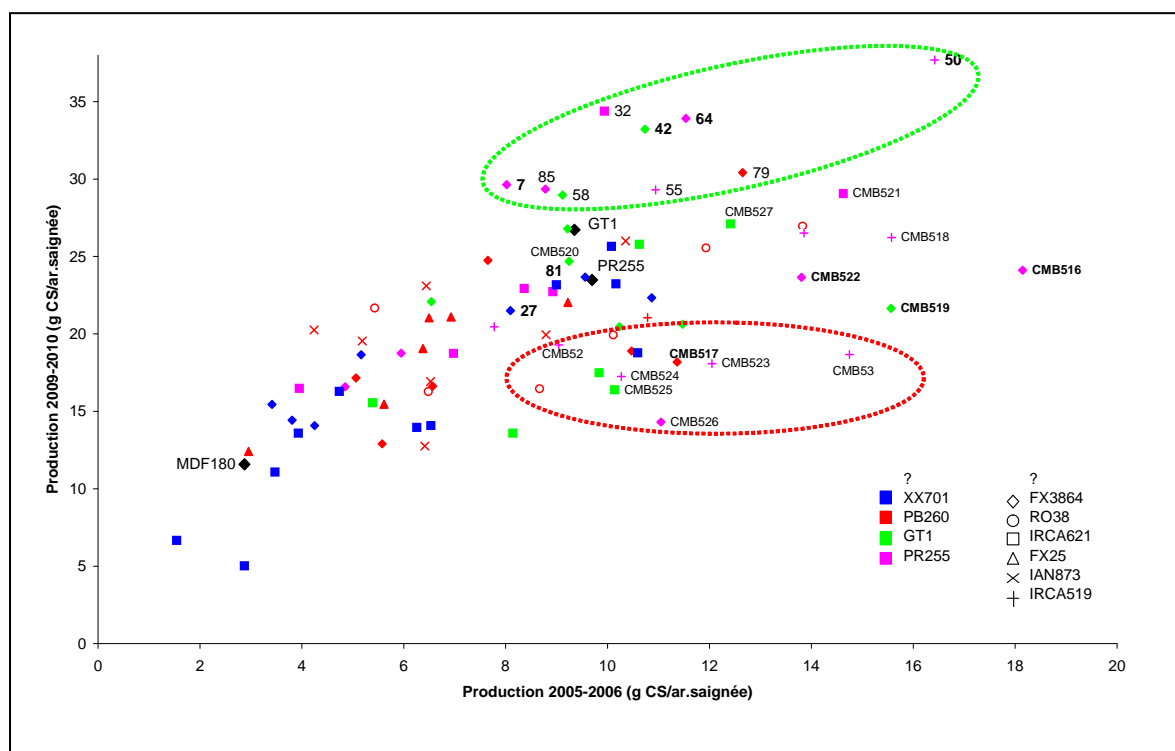
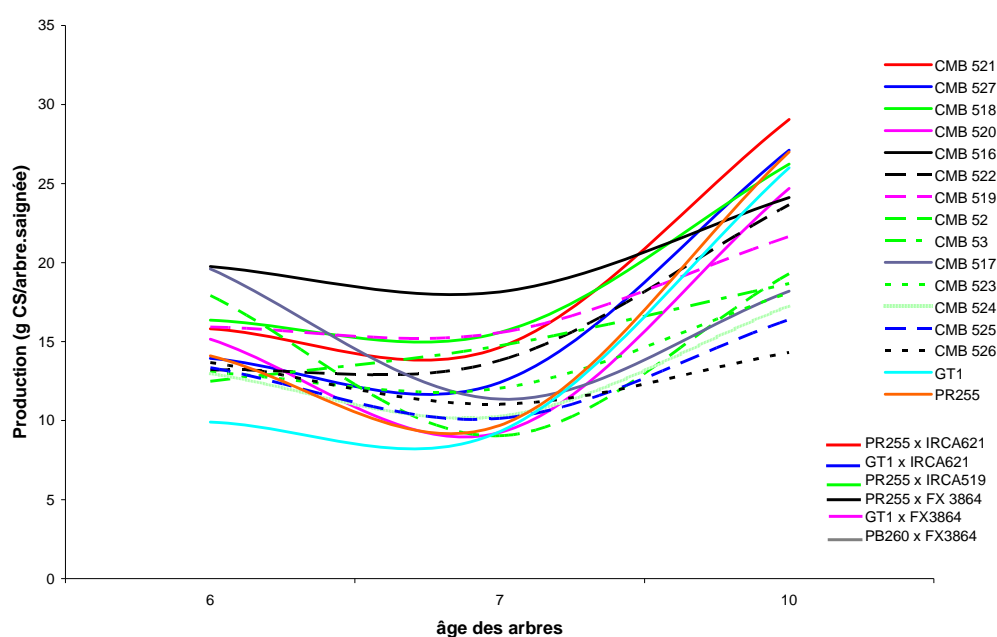


Figure 2 : Production des clones CMB sélectionnés



CCPE 4

- Actualisation du fichier base de données avec les mesures de circonférence 05/2010.

Sur 2407 arbres vivants issus de 10 croisements, 1193 (49%) ont atteint une circonférence supérieure ou égale à 45 cm et pourront être rouverts (saignée industrielle) à partir de décembre 2010 sur panneau B1 en ½ spirale (1.4m).

A la différence du CCPE3, ce sont tous les clones qui sont ouverts et non pas seulement les clones CMB.

- Recommandé pour les COV seulement sur les clones CMB sélectionnés : Analyser les caractéristiques *rectitude du tronc* (n°15), *couleur de l'écorce* (n°18), ***forme de la couronne*** (n°19) *intensité de la défoliation hivernale* (n°22), *début de défoliation* (n°23) sur les arbres de 9 ans.

CCPE 5

- Actualisation du fichier base de données avec les mesures de circonférence 05/2010.

- Recommandé pour les COV seulement sur les clones CMB sélectionnés : Analyser les caractéristiques *rectitude du tronc* (n°15), *couleur de l'écorce* (n°18), ***forme de la couronne*** (n°19), *intensité de la défoliation hivernale* (n°22), *début de défoliation* (n°23) sur les arbres de 8 ans.

CCPE 6

Analyse des données (1^{er} tour de saignée précoce) de sélection précoce du CCPE6-PEM

Cet essai (planté en décembre 2003, 6ans) a été ouvert en décembre 2009 (80% des arbres) et saigné sans stimulation en D/3 e D/4 jusqu'en juin 2010. L'essai comporte 9 familles de 10 clones à l'exception de RRIM703 x PB217 et PB310 x AC53 qui sont constitués respectivement de 5 clones et 1 clone.

- FX 3864 x FX985
- IRCA109 x PFB5
- IRCA109 x RO45
- RRIM703 x PFB5
- GT1 x AC53
- GT1 x RO45
- GT1 x TP21
- PB310 x FX3864
- RRIM703 x PB217
- PB310 x AC53

Variables analysées :

Production : quatre mesures de production humide et les DRC ont été faites successivement sur chacune des 4 répétitions. On analyse la valeur cumulée en caoutchouc sec par arbre au niveau parcellaire (**gCSarb**)

Circonférence : Les circonférences mesurées en 2010 font l'objet de l'analyse (**Circ2010**) .

Un seul DL a été fait en 2010, ce qui limite l'intérêt de l'analyse au niveau génotype.

On choisit d'estimer les BLUP (BLUPs, Best Linear Unbiased Predictors) des valeurs génétiques pour la production et la croissance.

Estimation des variances (Varcomp en modèle mixte, répétition en effet fixe) :

Variances	Circ2010	gCSarb
Fam	1765	4675
Clo(Fam)	1828	18628
Erreur	2813	3924
Total	6406	27227
h²F	0.27	0.17
h ² C	0.28	0.68
h²tot	0.55	0.85

L'héritabilité est forte pour la production principalement liée à une grande variabilité entre clones dans les familles. Pour la croissance, l'héritabilité moyenne est associée à une variabilité aussi importante au niveau familial qu'au niveau génotype.

Circ2010

Famille	Circ2010	Estimation* Circ2010	StdErrPred	Min95%	Max95%	Signif
IRCA109xPFB5	401.2	57.58	18.58	21.1	93.9	a
GT1xTP21	379.0	37.40	18.58	0.9	73.8	a
FX3864xFX985	369.9	29.01	18.58	-7.4	65.4	a
RRIM703xPFB5	368.6	25.12	18.59	-11.3	61.6	a

GT1xRO45	345.6	15.07	18.58	-21.4	51.5	a
IRCA109xRO45	324.9	-11.14	18.58	-47.6	25.3	a
PB310xFX3864	313.8	-21.26	18.58	-57.7	15.2	ab
PB310xAC53	268.6	-29.36	31.55	-91.2	32.5	ab
RRIM703xPB217	294.7	-38.44	21.55	-80.7	3.8	ab
GT1xAC53	271.4	-63.98	18.62	-100.5	-27.5	bc

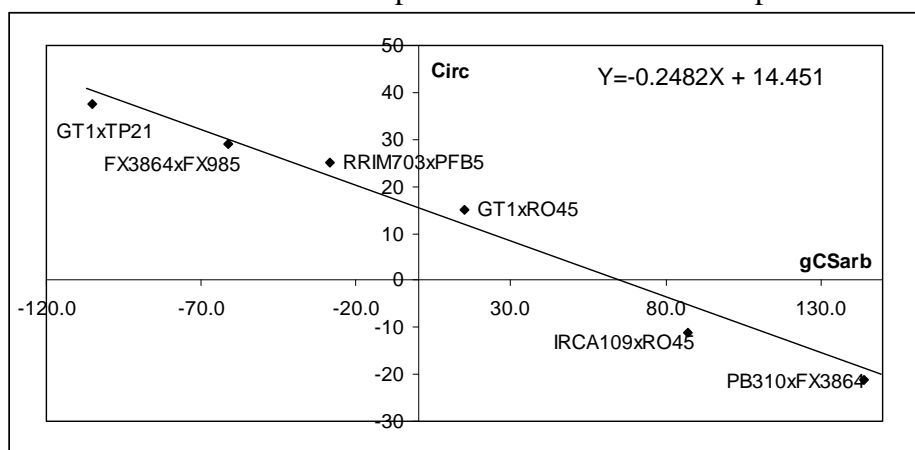
* écart à la moyenne générale, moyenne des 10 familles = 0

gCSarb

Famille	gCSarb	Estimation* gCSarb	StdErrPred	Min95%	Max95%	Signif
PB310xFX3864	406.8	143.9	45.6	54.6	233.3	a
IRCA109xRO45	347.3	87.2	45.5	-2.0	176.3	ab
GT1xRO45	291.5	14.9	45.5	-74.2	104.0	ab
PB310xAC53	196.3	7.7	72.4	-134.2	149.7	ab
GT1xAC53	215.7	3.5	48.2	-91.0	98.0	ab
IRCA109xPFB5	318.5	-14.7	46.0	-104.8	75.4	ab
RRIM703xPFB5	256.8	-28.7	45.5	-117.9	60.6	ab
RRIM703xPB217	134.2	-46.9	53.4	-151.6	57.9	ab
FX3864xFX985	207.9	-61.5	45.5	-150.7	27.7	bc
GT1xTP21	186.9	-105.4	45.7	-195.1	-15.8	bc

* écart à la moyenne générale, moyenne des 10 familles = 0

Relation linéaire inverse entre production et circonférence pour 6 familles du CCPE6.



Sélection de 20 clones sur leur production, leur circonférence (valeurs génétiques) et leur teneur en saccharose (valeur phénotypique, sans répétition). Une note de 1 a été attribuée pour les 20 meilleures productions, croissances et teneurs en saccharose.

Famille	Clone	gCSarb	Circ2010	Sac	Thiol	Pi	TSC	Note gCSarb	Note Circ	Note Sac	Note Totale
IRCA109xRO45	26	805.4	361.7	11.9	0.427	24.8	37.1	1	0	0	1
PB310xFX3864	92	541.3	325.4	17.5	0.567	15.8	43.0	1	0	0	1
RRIM703xPFB5	32	503.0	296.2	27.1	0.432	11.6	38.9	1	0	1	2
IRCA109xPFB5	19	497.0	353.0	28.5	0.713	24.8	17.9	1	0	1	2
PB310xFX3864	90	482.7	352.6	24.6	0.778	25.3	44.3	1	0	0	1
GT1xRO45	52	468.3	397.5	12.5	0.295	6.2	41.6	1	1	0	2
GT1xRO45	56	456.3	312.3	22.4	0.488	4.3	36.8	1	0	0	1
PB310xFX3864	91	449.1	365.0	21.3	0.587	7.1	37.4	1	0	0	1

GT1xRO45	58	418.3	345.5	29.4	0.476	2.6	36.7	1	0	1	2
RRIM703xPB217	75	376.3	287.5	38.7	0.324	10.9	45.2	1	0	1	2
FX3864xFX985	5	370.6	317.8	26.0	0.320	3.3	43.5	1	0	0	1
PB310xFX3864	89	368.7	375.9	25.7	0.723	9.7	39.2	1	1	0	2
RRIM703xPFB5	34	360.5	407.9	16.3	0.272	9.0	42.4	1	1	0	2
IRCA109xRO45	24	342.7	400.3	17.4	0.261	2.4	40.2	1	1	0	2
RRIM703xPFB5	37	341.5	267.8	28.2	0.473	19.4	37.8	1	0	1	2
FX3864xFX985	10	339.7	389.9	25.3	0.239	1.7	46.3	1	1	0	2
FX3864xFX985	8	332.8	324.8	32.8	0.544	8.2	40.0	1	0	1	2
RRIM703xPB217	76	190.8	383.5	29.3	0.314	9.5	47.8	0	1	1	2
GT1xRO45	60	172.4	381.7	32.3	0.395	1.4	37.9	0	1	1	2
IRCA109xPFB5	20	128.1	393.7	17.0	0.251	1.3	49.6	0	1	0	1

Cette sélection faite à partir des données issues de la première campagne de saignée précoce n'est pas définitive et sera complétée par les données du deuxième tour de saignée précoce en 2011.

Comme recommandé dans les précédents CCPE, il faudrait tenter de faire au minimum deux tours de DL au cours de la 1ère année de saignée précoce de façon à avoir au moins deux répétitions pour chaque clone et pouvoir estimer des valeurs génétiques pour ces caractéristiques.

Autres points :

- COV : il a été analysé les caractéristiques *rectitude du tronc* (n°15), *couleur de l'écorce* (n°18), *forme de la couronne* (n°19), *vigueur* (n°16), intensité de la défoliation hivernale (n°22), début de défoliation (n°23) sur les arbres de 7 ans.

CCPE 7

- Actualisation du fichier base de données avec les mesures de circonférence 05/2010.

CCPE 8

- Actualisation du fichier base de données avec les mesures de circonférence 05/2010.

CCPE 9. Analyse des données de croissance

Depuis octobre 2007, différentes mesures de croissance ont été effectuées sur cet essai environ chaque 6 mois de façon à encadrer la période froide et sèche (tableau suivant)

Date	Variable	Caractéristiques évaluées
oct-07	V8	Plantes vivantes(=1) et mortes (=0)
oct-07	V9	Hauteur des plantes
oct-07	V10	Diamètre du tronc à 10 cm du point de greffage
oct-07	V11	Diamètre du tronc à 1 m de hauteur
oct-07	V12	Diamètre du tronc à 1.7 m de hauteur
avr-08	V13	Plantes vivantes(=1) et mortes (=0)
avr-08	V14	Hauteur des plantes
avr-08	V15	Diamètre du tronc à 10 cm du point de greffage
avr-08	V16	Diamètre du tronc à 1 m de hauteur
avr-08	V17	Diamètre du tronc à 1.7 m de hauteur
oct-08	V18	Plantes vivantes(=1) et mortes (=0)
oct-08	V19	Hauteur des plantes
oct-08	V20	Diamètre du tronc à 1 m de hauteur
oct-08	V21	Diamètre du tronc à 1.7 m de hauteur
avr-09	V22	Plantes vivantes(=1) et mortes (=0)
avr-09	V23	Hauteur des plantes
avr-09	V24	Circonférence du tronc à 1 m de hauteur
avr-09	V25	Circonférence du tronc à 1.7 m de hauteur
oct-09	V26	Plantes vivantes(=1) et mortes (=0)
oct-09	V27	Hauteur des plantes
oct-09	V28	Circonférence du tronc à 1 m de hauteur
oct-09	V29	Circonférence du tronc à 1.7 m de hauteur
Juin-10	V30	Circonférence du tronc à 1 m de hauteur
oct-10	V31	Circonférence du tronc à 1 m de hauteur

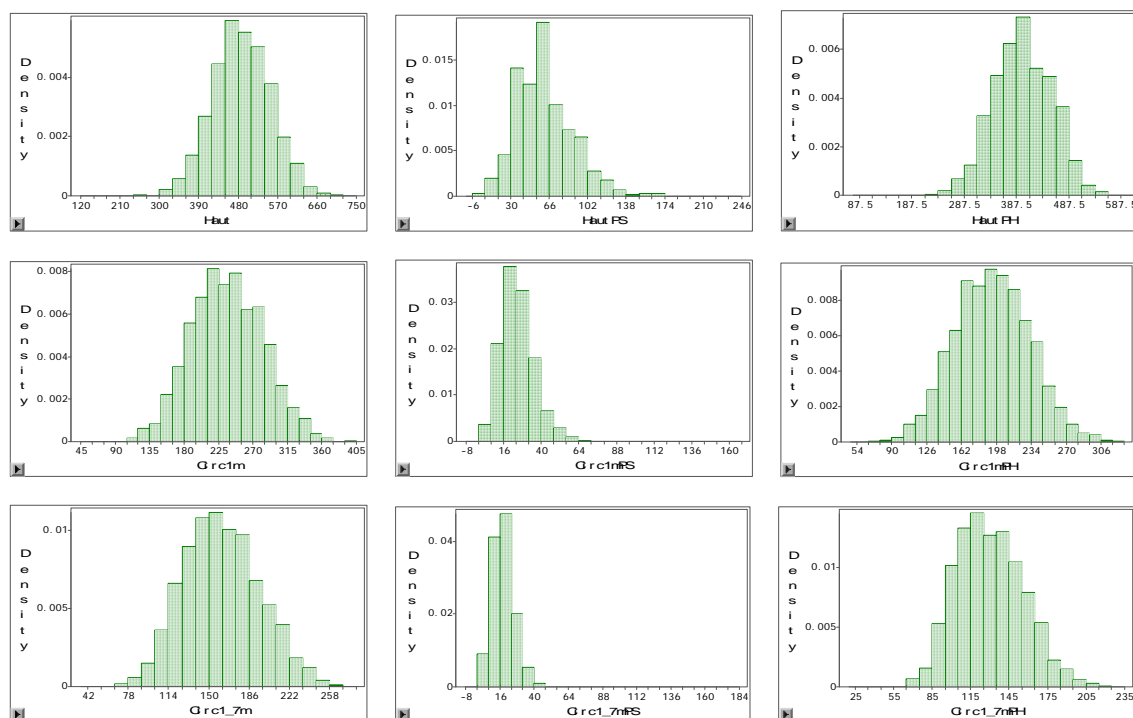
Les variations de croissance d'avril à octobre peuvent être des indicateurs de tolérance au froid et à la sécheresse. Pour vérifier cela, nous avons calculé les variations suivantes pour chaque arbre planté en mars 2006 (les replanting 2007 ne font pas partie de l'analyse) :

- Pour la hauteur des plantes en période sèche (PS) : V19-V14 ; V27-V23 ;
- Pour l'accroissement de la circonférence du tronc à 1m en PS: V20-V16 ; V28-V24 ; V31-V30
- Pour l'accroissement de la circonférence du tronc à 1.7m en PS : V21-V17 ; V29-V25 ;
- Pour la hauteur des plantes en période humide (PH) : V14-V9 ; V23-V19 ;
- Pour l'accroissement de la circonférence du tronc à 1m en PH: V16-V11 ; V24-V20 ; V30-V28 ;
- Pour l'accroissement de la circonférence du tronc à 1.7m en PH : V17-V12; V25-V21.

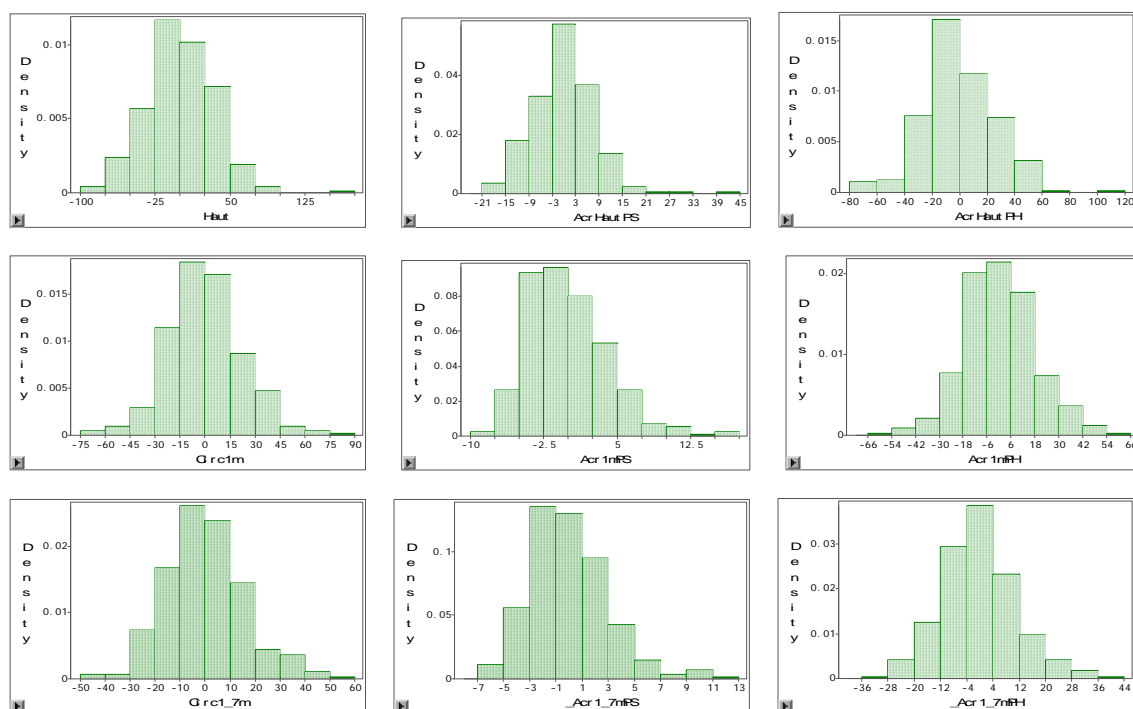
Les valeurs génétiques de chaque génotype ont été calculées (Proc mixed de SAS). Les valeurs sont centrées sur la moyenne de l'ensemble des mesures pour chaque variable.

Distribution des données

Distribution des valeurs **phénotypiques individuelles (3086 arbres)** de hauteur et de circonférences à 1m et à 1.7m du sol (valeurs 2010) et des valeurs phénotypiques individuelles d'accroissement en période sèche et en période humide.



Distribution des **valeurs génotypiques (268 génotypes)** de hauteur et de circonférences à 1m et à 1.7m du sol (valeurs 2010) et des valeurs phénotypiques d'accroissement en période sèche et en période humide.



Analyse de variance

L'analyse de variance (proc glm de SAS) montre qu'il existe des différences significatives entre génotypes pour l'ensemble des variables de croissance et d'accroissement en période sèche et humide.

	Source	Moyenne	ddl	Valeur F	Pr >F
Hauteur (V27)	Répétition		3	125.29	< 0.0001
	Génotype	485.62	267	6.83	< 0.0001
Circ 1m (V31)	Répétition		3	35.14	< 0.0001
	Génotype	235.96	267	5.86	< 0.0001
Circ 1.7m (V29)	Répétition		3	125.58	< 0.0001
	Génotype	161.12	267	5.71	< 0.0001
Croissance hauteur PS	Répétition		3	11.52	< 0.0001
	Génotype	61.49	267	2.79	< 0.0001
Croissance circ1m PS	Répétition		3	6.52	0.0002
	Génotype	24.83	267	3.56	< 0.0001
Croissance circ1.7m PS	Répétition		3	5.39	0.0011
	Génotype	17.91	267	3.63	< 0.0001
Croissance hauteur PH	Répétition		3	170.70	< 0.0001
	Génotype	399.31	267	5.91	< 0.0001
Croissance circ1m PH	Répétition		3	34.11	< 0.0001
	Génotype	193.48	267	5.37	< 0.0001
Croissance circ1.7m PH	Répétition		3	90.69	< 0.0001
	Génotype	129.84	267	4.81	< 0.0001

Corrélations entre variables

Le tableau 2 donne les corrélations entre variables. Celles-ci sont fortes entre la hauteur des arbres, leur circonférence à 1m et leur circonférence à 1.7m (valeurs en gras italique). Ces corrélations restent fortes (valeurs en gras soulignées) avec les variations de croissance au cours de la période humide (période à plus forte croissance). Ces corrélations bien que plus faibles ne sont pas négligeables si considère les variations de croissance au cours de la période sèche (valeurs en gras). Enfin, on observe des corrélations moyennes mais significatives entre les variations de croissance en période sèche et celles mesurées en période humide (valeurs soulignées).

Tableau 2 : corrélations entre variables (Proc corr de SAS)

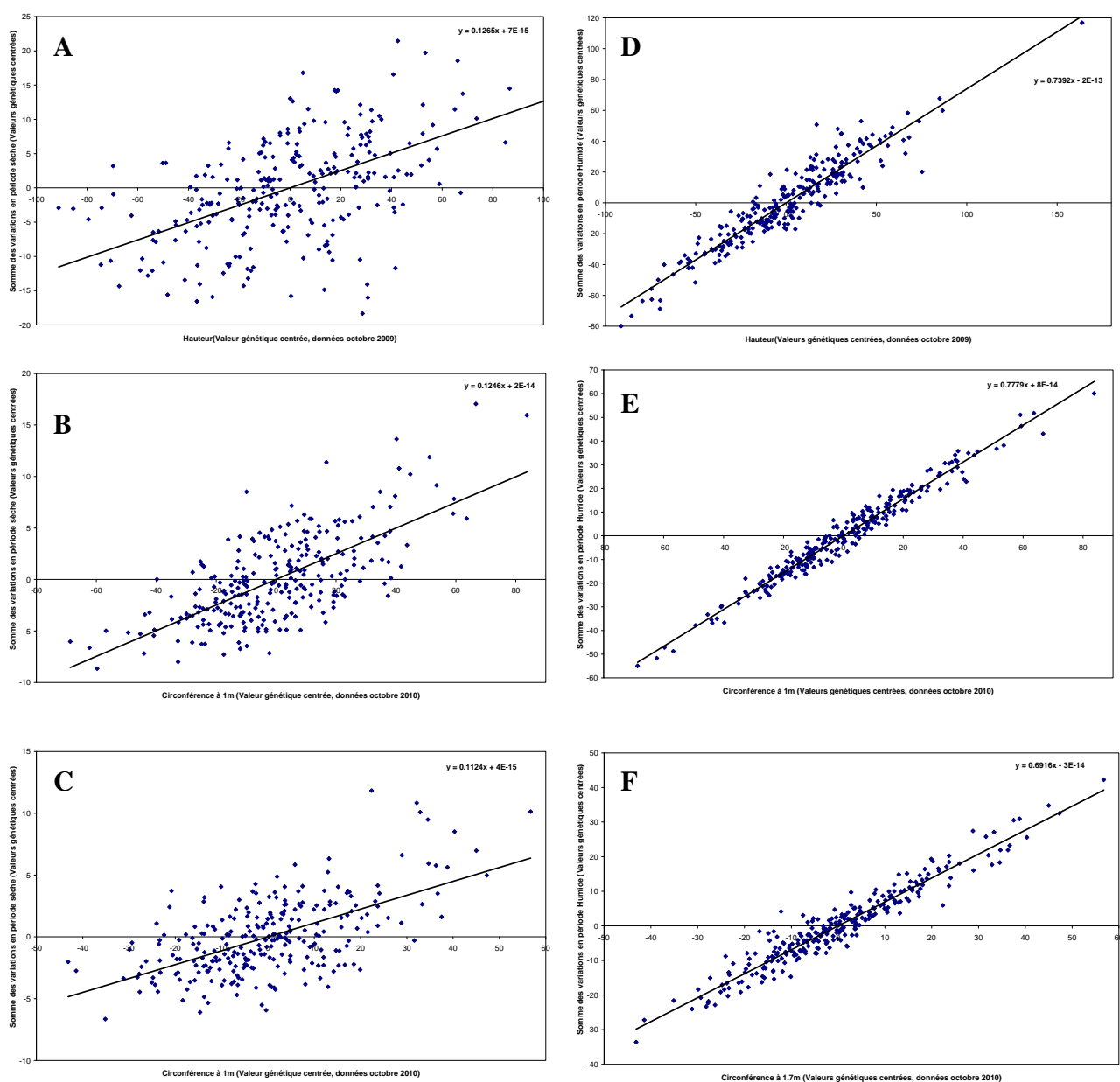
	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Hauteur (V27)	<i>0.770</i> <0.0001	<i>0.815</i> <0.0001	<i>0.537</i> <0.0001	0.375 <0.0001	0.321 <0.0001	<i>0.939</i> <0.0001	0.780 <0.0001	0.798 <0.0001
2. Circ 1m (V31)		<i>0.969</i> <0.0001	0.312 <0.0001	<i>0.685</i> <0.0001	0.619 <0.0001	0.760 <0.0001	<i>0.982</i> <0.0001	0.929 <0.0001
3. Circ 1.7m (V29)			0.345 <0.0001	0.633 <0.0001	<i>0.592</i> <0.0001	0.800 <0.0001	0.953 <0.0001	<i>0.960</i> <0.0001
4. Croissance hauteur PS				0.177 0.0036	0.225 0.0002	<i>0.238</i> <0.0001	0.319 <0.0001	0.342 <0.0001
5. Croissance circ1m PS					0.812 <0.0001	0.365 <0.0001	<i>0.562</i> <0.0001	0.532 <0.0001
6. Croissance circ1.7m PS						0.287 <0.0001	0.540 <0.0001	<i>0.456</i> <0.0001

7. Croissance hauteur PH							0.770 <0.0001	0.788 <0.0001
8. Croissance circ1m PH								0.931 <0.0001

(9) : Croissance circ1.7m PH

La comparaison entre les variations de croissance en période sèche et la croissance finale (figures suivantes), montre qu'il existe une relation étroite entre l'aptitude à croître pendant la saison sèche et la croissance finale relevée en octobre 2010 autant pour la hauteur des arbres (Fig.2-A), que pour la circonférence à 1m (Fig.2-B) et 1.7m (Fig.2-C). On trouve une corrélation encore plus forte si on associe les valeurs finales mesurées et les accroissements en hauteur et circonférence en période Humide (Fig. 2-D, 2-E, 2-F).

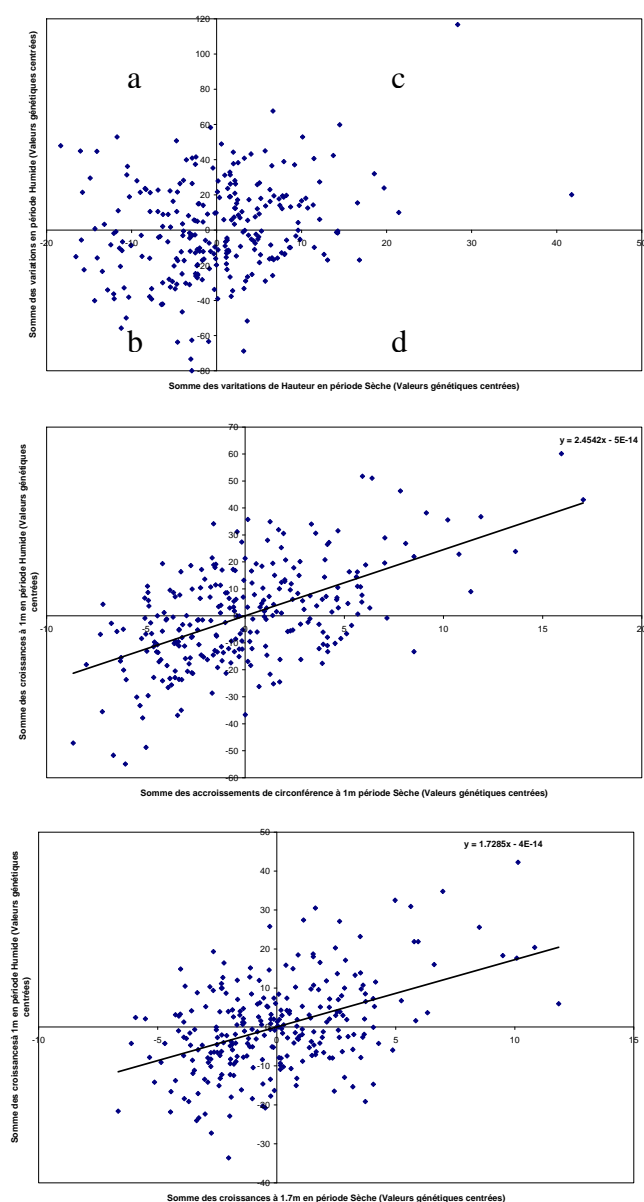
Figure 2 : Relation entre croissance finale (données 2010) et accroissement en période sèche (A, B, C) ou humide (D, E, F).



Par contre, cette relation est plus faible si on compare les variations de croissance entre la période sèche et la période humide pour la hauteur et la circonférence à 1m et 1.7m. D'après les graphiques de la figure 3, il semblerait que toutes les situations suivantes peuvent être rencontrées :

- a- plus forte croissance en PS et plus faible croissance en PH (comparaison par rapport à la moyenne de l'essai)
- b- plus faible croissance en PS et en PH
- c- plus forte croissance en PS et en PH
- d- plus faible croissance en PS et plus forte croissance en PH

Figure 3 : Relation entre accroissement en période sèche et accroissement en période humide.

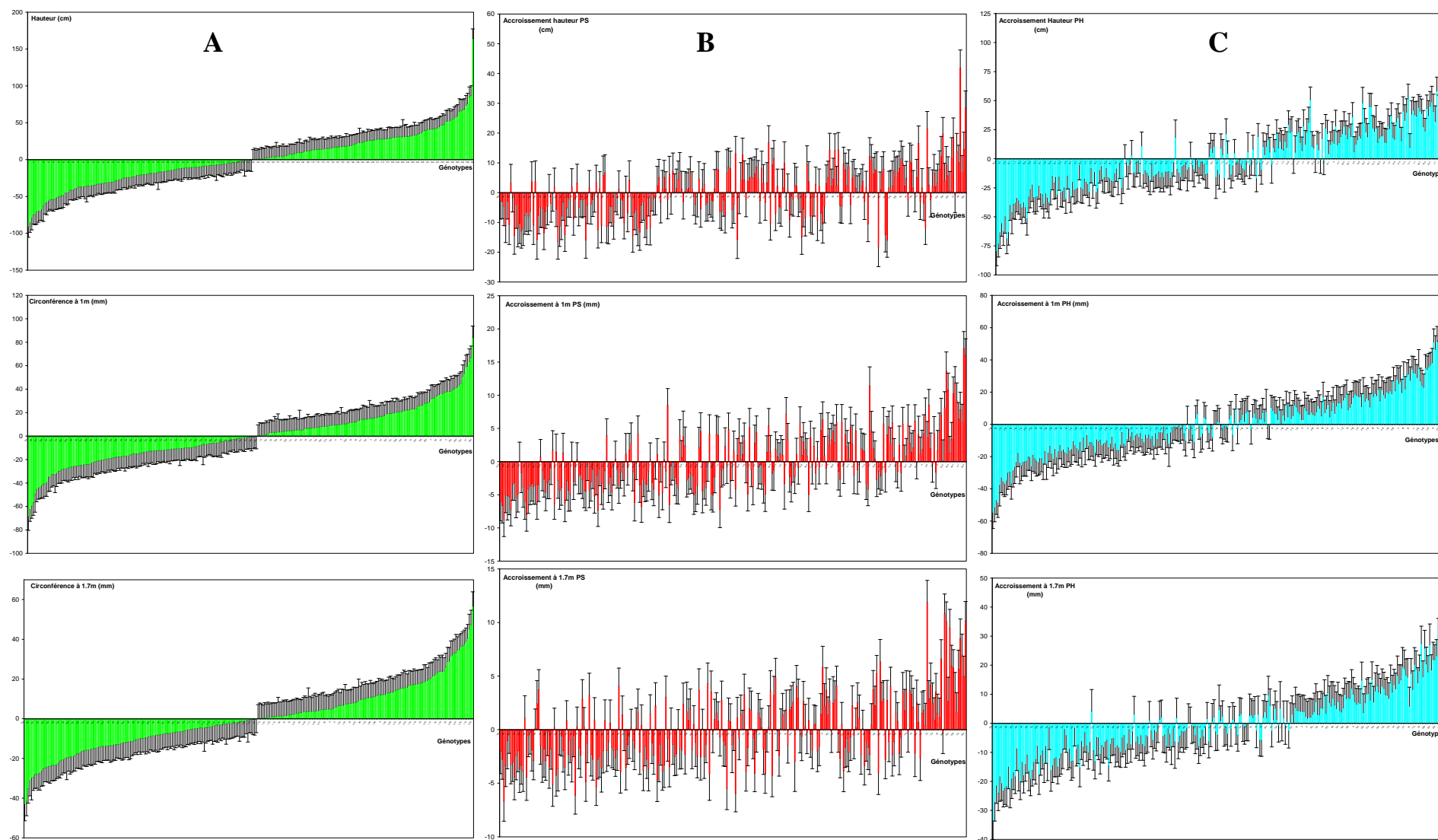


Une autre façon d'observer la relation entre la croissance finale et les accroissements au cours de la période sèche et humide est d'établir un classement croissant des génotypes sur

leur valeur génotypique de croissance finale et d'observer comment se distribuent les valeurs d'accroissement (Fig.4). Pour les trois variables analysées, les figures montrent que les génotypes qui présentent les meilleures croissances sont souvent des génotypes qui présentent à la fois les plus fortes croissances en période humide et en période sèche (l'inverse est vrai pour les génotypes qui présentent les plus faibles croissances). Toutefois, on constate aussi, que pour plusieurs génotypes dont la croissance finale est supérieure mais proche de la moyenne de l'essai, la période sèche peu être limitante. A l'inverse, pour des génotypes dont la croissance est inférieure à la moyenne de l'essai, une compensation « faible » peut se faire par un accroissement supérieur à la moyenne de l'essai en période sèche. Les dénombrements suivants sont obtenus :

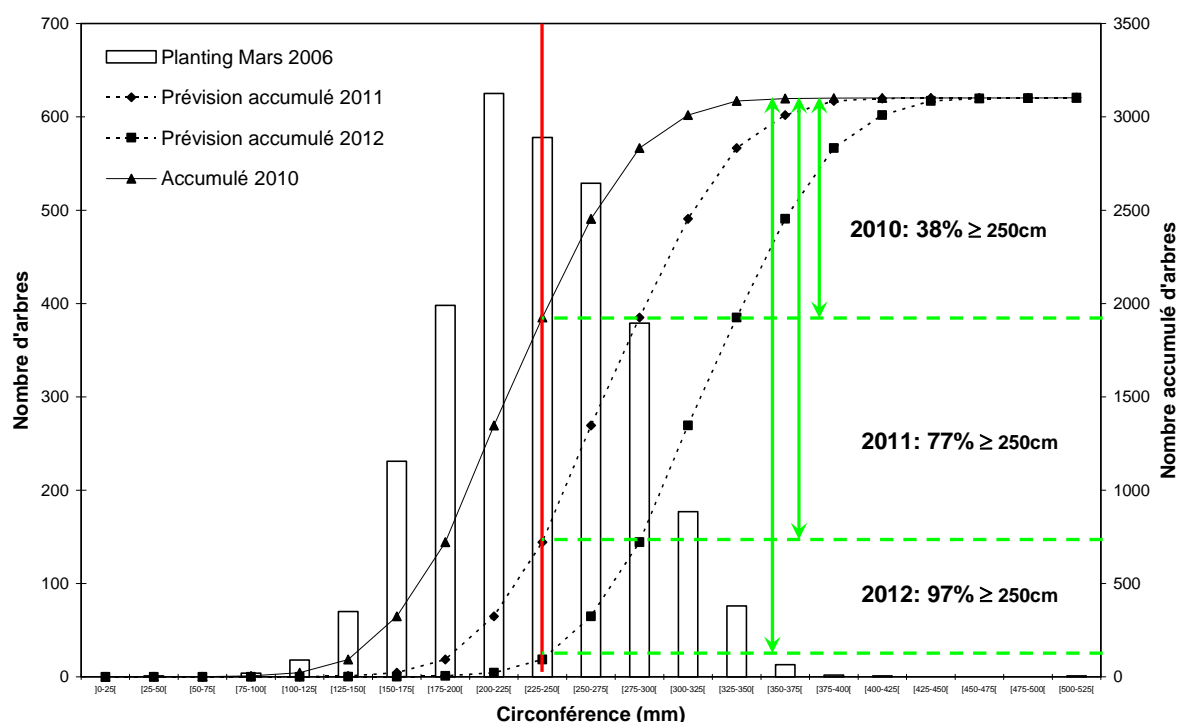
Variable	Croissance ≥ 0				Croissance < 0			
	PS ≥ 0 , PH ≥ 0	PS ≥ 0 , PH < 0	PS < 0 , PH ≥ 0	PS < 0 , PH < 0	PS ≥ 0 , PH ≥ 0	PS ≥ 0 , PH < 0	PS < 0 , PH ≥ 0	PS < 0 , PH < 0
Hauteur	71	22	40	0	1	39	10	85
Circ 1m	81	8	41	0	1	30	7	100
Circ 1.7m	70	13	44	2	2	39	2	88

Figure 4 : Classement des géotypes sur leurs valeurs finales de croissance (données 2010, A) et observation de leur accroissement en période sèche (B) et humide (C). (Représentation des valeurs géotypiques centrées sur la moyenne de l'essai).



Prévision de saignée des arbres

Les données de croissance d'octobre 2010 indiquent que cet essai ne pourrait être ouvert avec 97% des arbres dont la circonférence serait supérieure à 25cm qu'à partir d'octobre 2012.



Autre variable à analyser en 2011

Comme variable supplémentaire, il est proposé d'effectuer des évaluations de défoliation/ refoliation sur chaque arbre de juin à juillet en utilisant une échelle de 1 à 5 : (1) pas de défoliation ; (2) en cours de défoliation ; (3) totalement défolié ; (4) en cours de refoliation ; (5) complètement refolié.

CCPE 10

- Actualisation du fichier base de données avec les mesures de circonférence 05/2010.

CCPE 11

- Actualisation du fichier base de données avec les mesures de circonférence 05/2010.

CCPE 12

- A rédiger protocole de l'essai (NS)

CCPE13 (proposition de Cassio)

IAN3087

IAN3156	FX516 x PB86
IAN2903	FX516 x PB86
IAN2880	
IAN2878	FX516 x PB86

Voir s'il est possible de les intégrer dans un CCGE plutôt qu'un CCPE.

CCGE 7, 8, 9, 10, 11

- Actualisation du fichier base de données avec les mesures de circonférence 05/2010.

COV

- Entraînement à la détermination des caractéristiques DHE sur les clones CMB sélectionnés dans les CCPE3 et 4.
- A récupérer, les données des évaluations des caractéristiques des clones CMB des clones des CCPE 3 et 4.
- Proposition : envoyer des feuilles des clones CMB (CCPE 3 et 4) pour réaliser le génotypage de ces clones avec des marqueurs SSR, afin de déposer la demande de COV avec cette information.
- Révision du document traduit en portugais. Ce document (version en portugais) sera remis au SNPC afin de déposer les premiers COV au Brésil.

Préparation du matériel pour le projet transcriptôme Hevea

- voir protocole modifier. Problème de compresseur de la chambre froide (en cours de remplacement), problème de retard dans les greffages pour les clones PB260 et PR255.
- Le protocole a été adapté en fonction des tubes et des produits disponibles.
- Des explications ont été apportées pour la préparation et l'échantillonnage du matériel.